

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg - Universität Mainz

Untersuchungen zur
Energieabhängigkeit der Histaminfreisetzung
aus Peritonealmastzellen der Ratte

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg - Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Brigitte Friedrich geb. Maaß
aus Nack

Mainz 1976

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg - Universität Mainz

Untersuchungen zur
Energieabhängigkeit der Histaminfreisetzung
aus Peritonealmastzellen der Ratte

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg - Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Brigitte Friedrich geb. Maaß
aus Nack

Mainz 1976



Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein

1. Gutachter: Professor Dr. G. F. Kahl

2. Gutachter: Professor Dr. K. J. Netter

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 24.11. 1976

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung	1
Neuere Theorien über den Mechanismus der Histaminfreisetzung	1
1. Intrazelluläre Histaminfreisetzung	2
2. Histaminfreisetzung durch extrazellulären Kationenaustausch im Anschluß an die Ausstoßung der Granula	3
3. Histaminfreisetzung durch extrazellulären Kationenaustausch aus Granula, die noch innerhalb des Mastzellkörpers liegen und aus ausgestoßenen Granula	4
Energieabhängigkeit der Histaminfreisetzung	9
1. Bedeutung des aeroben Stoffwechsels	9
2. Bedeutung des anaeroben Stoffwechsels	14
3. Zusammenhang zwischen intrazellulärem ATP-Spiegel und Histaminfreisetzung	17
4. Bedeutung des intrazellulären cAMP-Spiegels für den Histaminfreisetzungsprozeß	19
Ziel der Arbeit	25
Methoden	27
1. Gewinnung der Peritonealzellen	27
2. Mastzellisolation	28
3. Färben und Zählen der Mastzellen, Messen des	

Zelldurchmessers und Fotografieren der Zellen	31
4. Histaminbestimmung	32
5. Versuchsbeschreibungen	33
a) Vorbereitung der Peritonealzellen zur Inkubation	33
b) Erstellung der Zeitwirkungskurve für Substanz 48/80	34
c) Erstellung der Dosiswirkungskurve für Substanz 48/80	35
d) Histaminfreisetzungsversuche unter anoxischen Bedingungen	36
6. Statistische Auswertung der Ergebnisse	38
7. Chemikalien	39
E r g e b n i s s e	40
1. Anfärben der Mastzellen	40
2. Eigenschaften der Mastzellen aus Peritoneal- spülflüssigkeit	41
a) Mastzellgehalt der Peritonealspülflüssigkeit	41
b) Zelldurchmesser	42
c) Mastzellmorphologie	45
d) Histamingehalt der Mastzellen	47
3. Wirkung von Substanz 48/80 auf Mastzellen aus Peritonealspülflüssigkeit	49
a) Zeitwirkungskurve von Substanz 48/80 mit und ohne Glucose	50
b) Vergleich der Degranulationsrate von Mast- zellen nach Inkubation mit Substanz 48/80 mit dem Prozentsatz an freigesetztem Histamin	50

c)	Dosiswirkungskurve für Substanz 48/80	53
d)	Substrateffekte auf die Histaminfreisetzung durch Substanz 48/80 in Gegenwart von Sauer- stoff	54
4.	Histaminfreisetzung in Anoxie	56
a)	Mindestanoxiedauer mit maximaler Hemmung der Histaminfreisetzung	56
b)	Wiederherstellung der Histaminfreisetzung in Anoxie durch verschiedene Substrate oder Sauerstoff	58
D i s k u s s i o n		68
Charakteristika von Peritonealmastzellen der Ratte:		
	Mastzellmenge, Mastzelldurchmesser, Histamingehalt	68
	Zeitwirkungskurve von Substanz 48/80	71
	Beeinflußbarkeit der Histaminfreisetzung durch verschiedene Substrate unter Sauerstoff	73
	Hemmung der Histaminfreisetzung durch Anoxie:	
	Abhängigkeit von der Dauer der substrat- und sauer- stofffreien Präinkubation	76
	Wiederherstellung der Histaminfreisetzung in Anoxie durch Substrat- bzw. Sauerstoffzufuhr	77
Z u s a m m e n f a s s u n g		86
L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s		88



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E i n l e i t u n g

Neuere Theorien über den Mechanismus der Histaminfreisetzung

Zum Mechanismus der Histaminfreisetzung aus Mastzellen wurden in den letzten 30 Jahren verschiedene Hypothesen entwickelt. Sowohl enzymatische als auch auf Ionenaustausch beruhende Vorgänge wurden für die Auslösung des Freisetzungsmechanismus verantwortlich gemacht.

Eine Zusammenfassung über die älteren Vorstellungen gibt KAHL (1966).

Die älteren Studien bis ca. 1965 beschäftigen sich hauptsächlich damit, die enzymatische Theorie zu bekräftigen und verschiedene in Betracht kommende Fermente, wie zum Beispiel Lecithinase A, Chymotrypsin, zu untersuchen.

THON und UVNÄS (1967) stellten eine Hypothese auf, derzufolge die Histaminfreisetzung als ein Zweistufenprozeß abläuft: Der Freisetzung der histaminhaltigen Granula aus der Mastzelle durch einen aktiven, energieerfordernden Transport, die demzufolge ein enzymatischer Prozeß ist, und einer darauffolgenden extrazellulären Freisetzung des Histamins aus seiner Bindung in den Granula, die auf einem nicht energiebedürftigen Kationenaustausch beruht.

In der Folgezeit bis zum heutigen Tag zielt die Forschung über den Mechanismus der Histaminfreisetzung dahin, zu ermitteln, ob eine Histaminfreisetzung erst nach Austritt der Granula aus der Mastzelle stattfinden kann oder ob sie auch schon eintritt,

solange sich die Granula noch innerhalb des Mastzellkörpers befinden.

Verschiedene experimentelle Wege wurden beschritten, um die eine oder andere Hypothese zu bekräftigen.

1. Intrazelluläre Histaminfreisetzung

BLOOM und HAEGERMARK (1965, 1967) betrieben elektronenmikroskopische Studien an gemischten Peritonealzellpopulationen nach Inkubation mit verschiedenen 48/80- oder Bienengiftkonzentrationen. Diese beiden Liberatoren erzielten gleichartige Veränderungen an den Mastzellen, die dosisabhängig waren. Es treten zunächst Veränderungen der randständigen Granula ein, die in einer geringen Größenzunahme, vergrößertem Zwischenraum zwischen Granulummatrix und Perigranulärmembran, Abnahme der Elektronendichte und Auftreten eines retikulären Netzwerkes in der Granulummatrix bestehen -sogenannte veränderte Granula-.

Danach kommt es zum Zusammenschluß und darauffolgender Auflösung nahegelegener Perigranulärmembranen, die in einer Bildung von Vakuolen resultiert, in denen mehrere solcher veränderter Granula liegen. Da bei geringen Liberatordosen nur wenige Granula aus dem Mastzellkörper ausgestoßen werden, es aber bereits zur Histaminfreisetzung kommt, diskutieren obengenannte Autoren eine "intrazelluläre" Histaminfreisetzung aus solchen veränderten Granula in den Vakuolen, die in keiner sichtbaren Verbindung mit der Extrazellulärflüssigkeit stehen. Als mögliche Ursache für die Histaminfreisetzung führten sie eine eventuelle

Permeabilitätszunahme der Zell- und Zytoplasma-membranen an, die es intra- und extrazellulären Kationen ermöglicht, Histamin aus seiner intragranulären Bindung zu befreien.

2. Histaminfreisetzung durch extrazellulären

Kationenaustausch im Anschluß an die Ausstoßung der Granula

Im Gegensatz zu dieser Hypothese stehen die Arbeiten von FILLION et al. (1970), NOSAL et al. (1970) und SLORACH (1971). Ihre vergleichenden biochemischen Studien an isolierten Mastzellen und an isolierten Granula mit dem Histaminliberator Compound 48/80 führten zu dem Ergebnis, daß die Histaminfreisetzung durch extrazellulären Kationenaustausch erst nach primärer Ausstoßung der Granula aus dem Mastzellkörper stattfindet. Sie bestätigen somit die Zweistufentheorie von THON und UVNÄS (1967).

Oben zitierte Autoren benutzten ^{35}S -markiertes Heparin als Maß für die Freisetzung der Mastzellgranula nach Inkubation mit 48/80. Aus der guten Korrelation zwischen dem Zeitbedarf der Histamin- und der Granulafreisetzung (NOSAL et al., 1970) und dem prozentualen Verhältnis an freigesetztem Histamin zu freigesetztem ^{35}S -Heparin (ca. 1,5), kamen sie zu obiger Schlußfolgerung.

Sie stellten jedoch zur Diskussion, daß mit ihren Ergebnissen einer, wenn auch nur geringen relativen Mehrfreisetzung an Histamin, die Möglichkeit einer teilweisen Histaminfreisetzung ohne vorherige Granula-

ausstoßung nicht ausgeschlossen werden kann.

Sie glauben jedoch nicht an eine intrazelluläre Histaminliberierung, wie BLOOM und HADGERMARK (1965, 1967) sie vertraten, sondern eher an einen extrazellulären Kationenaustausch infolge Kommunikation der veränderten granulahaltigen Vakuolen oder Tubuli mit der Extrazellulärflüssigkeit.

3. Histaminfreisetzung durch extrazellulären Kationenaustausch aus Granula, die noch innerhalb des Mastzellkörpers liegen und aus ausgestoßenen Granula
- RÖHLICH et al. (1971) und LAGUNOFF (1972) scheinen eine Möglichkeit gefunden zu haben, die Diskrepanz zwischen der "intrazellulären" und "extrazellulären" Kationenaustauschtheorie zu beseitigen, indem sie zeigen, daß die intrazelluläre Lage der veränderten Granula in den Vakuolen als biologisch extrazellulär angesehen werden muß.
- Obwohl die beiden Autoren unterschiedliche Histaminliberatoren benutzten (RÖHLICH et al.: 48/80; LAGUNOFF: Polymyxin B-Sulfat), kamen sie bei ihren elektronenmikroskopischen Studien zu den gleichen Ergebnissen bezüglich der morphologischen Veränderungen der Mastzellen nach Inkubation mit dem Liberator. Mit Janthanum und Hämoglobin (RÖHLICH et al.) sowie Ruthenium Rot und Ferritin (LAGUNOFF), die als Markierungssubstanzen für extrazellulär gelegene Granula und Extrazellulärraumgrenzmembranen dienten, konnten sie demonstrieren, daß die während der Degranulation intrazellulär gebildeten Vakuolen und

das Netzwerk von Kanälen mit dem Extrazellulärraum kommunizieren, denn die Markierungssubstanzen reicherten sich hier im Gegensatz zu nicht degranulierten Mastzellen auch tief im Inneren der Zelle an allen Vakuolenwänden und auf den veränderten Granula an. Die veränderten Granula, deren Membranen durch Fusion untereinander und mit der Zellmembran die Vakuolen auskleiden, sind also von Extrazellulärflüssigkeit umgeben und deshalb als biologisch extrazellulär gelegen anzusehen.

Es wird deshalb diskutiert, daß auch für diese "intrazellulär" gelegenen Granula die Ionenaustauschtheorie mit extrazellulären Kationen ihre Gültigkeit behält.

LAGUNOFF (1972) konnte außerdem zeigen, daß nach Inkubation der Mastzellen mit Polymyxin B-Sulfat, zusammen mit Histamin auch in gleichem Maße N-acetyl- β -Glucosaminidase, ein leicht ablösbares Enzym aus den Mastzellgranula mitfreigesetzt wird, nicht aber, oder nur in geringem Maße, die unlöslichen Granulakomponenten Chymase und Heparin. Aus dieser Tatsache folgerte er, daß Histamin auch ohne Ausstoßung der Granula aus dem Mastzellkörper freigesetzt werden kann. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu denen von FILLION et al. (1970), NOSAL et al. (1970) und SLORACH (1971).

LAGUNOFF schränkt aber die Vergleichsmöglichkeit dadurch ein, daß jene Autoren die Heparin- und Histaminfreisetzung durch 48/80 und nach verschiedenen Waschvor-

gängen erreichten.

RÖHLICH et al. (1971) beschrieb die Degranulation der Mastzellen als einen aktiven Zellprozeß der Exozytose, wie er für einige andere exokrine Drüsenzellen (Pankreas, Parotis) beschrieben wurde (ICHIKAWA, 1965; AMSTERDAM et al., 1969). Die Verschmelzung der Perigranulärmembranen von peripher gelegenen Granula mit der Zytoplasmamembran resultiert in einer Bildung von Poren, die nur durch ein dünnes Diaphragma verbunden sind. Nachfolgendes Einreißen dieser dünnen Membranen ermöglicht das Austreten der Granulummatrix.

Dieser Prozeß schreitet in das Zellinnere fort, bis am Ende die Zelle von einem komplizierten Netzwerk von Kanälen und Höhlen durchzogen wird, in denen viele veränderte Granula liegen. RÖHLICH diskutiert, daß diese Diaphragmamembranen möglicherweise wie semipermeable Membranen, vergleichbar denen der Kapillarendothelien, wirken (WOLF und MERKER, 1966) und den extrazellulären Ionen freien Eintritt gewähren, die dann die strukturellen Veränderungen an der Granulummatrix bewirken können.

TIZARD und HOLMES (1974) bestätigen die Befunde von RÖHLICH et al. (1971). Sie zeigten in einer raster-elektronenmikroskopischen Studie an nicht isolierten Mastzellen, daß die Mastzelloberfläche gleichartige morphologische Veränderungen nach Inkubation mit 48/80, Polymyxin B-Sulfat und spezifischem Antigen durchmacht. Granula werden durch einen Exozytoseprozeß aus dem Mastzellkörper entlassen, ebenso konnten sie

die Entstehung von Poren, die nicht immer in Zusammenhang mit Granulaausstoßung steht, beobachten. Auch ihre Schlußfolgerung ist, daß der Prozess der Porenbildung und der Exozytose gleichermaßen bedeutungsvolle Mechanismen in der Mastzelldegranulation darstellen müssen.

Bis heute scheint also der Mechanismus der Histaminlösung aus dem Protein-Heparin-Komplex in den Granula durch energieunabhängigen Kationenaustausch (insbesondere Na^+ -Ionen) weitgehend unbestritten zu sein (THON und UVNÄS, 1967; UVNÄS, 1974; ANDERSON et al., 1974 und andere).

Welcher Vorgang während der Histaminfreisetzung ist aber nun der eigentlich enzymatische oder energieabhängige Prozeß? Daß ein energieabhängiger Schritt bei dem Liberierungsprozeß von Bedeutung ist, dafür sprechen zahlreiche Befunde (Zitate im nächsten Abschnitt der Einleitung). Viele Prozesse könnten den energieabhängigen Schritt darstellen:

- die Bindung des Histaminliberators (egal ob spezifisches Antigen oder künstlicher Liberator wie 48/80 und andere) an die Mastzelloberfläche
- die Aktivierung von enzymatischen Schritten, die den Degranulationsprozeß einleiten
- die Entfernung von Inhibitoren
- die intrazelluläre Veränderung der verschiedenen Membranen, eventuell Permeabilitätsänderungen
- die Fusion von Membranen und die intrazelluläre Bewegung der Granula

- die aktive Zelleistung der Exozytose der Granula aus dem Mastzellkörper heraus
- vielleicht sogar nur die Aufrechterhaltung der Zellstruktur während Einwirkung des Histaminliberators.

Für keine Hypothese konnte bisher eine Klärung erbracht werden.

Daß die Histaminfreisetzung durch 48/80 und Antigen nicht durch eine generelle Schädigung der Mastzellmembran stattfindet, dafür erbringen etliche Autoren Hinweise:

DIAMANT (1967) zeigte, daß der ATP-Gehalt der Zelle während 48/80-Inkubation nicht vermindert wird.

JOHNSON und MORAN (1959) berichteten, daß während der Histaminfreisetzung durch 48/80 oder Antigen keine begleitende Freisetzung an Mastzell-ATP, Lactatdehydrogenase, saure Phosphatase und K^+ -Ionen erfolgt.

THON und UVNÄS (1967) zeigten, daß degranulierte Mastzellen nach einmaligem Waschen wieder fähig sind, auf eine nochmalige Zugabe von 48/80 mit Degranulation und Histaminfreisetzung zu antworten.

Den Befund von THON und UVNÄS konnten DIAMANT et al. (1970) bestätigen, indem sie 48/80 mittels Mikroapplikationstechnik unter mikroskopischer Beobachtung direkt auf verschiedene Stellen der Mastzelloberfläche gaben. Sie beobachteten, daß nach einmaliger lokal begrenzter Degranulation mit Histaminfreisetzung die Mastzelle nicht tot war; sie konnte nach erneuter Applikation des Liberators an einer anderen Stelle ihrer Oberfläche und auch an die gleiche Stelle sofort wieder mit Ausstoßung von Grana und zusätzlicher Histaminfreisetzung antworten.

Energieabhängigkeit der Histaminfreisetzung

Seitdem PARROT (1942, zit. nach KAHL, 1966) erstmalig beschrieben hatte, daß die Histaminfreisetzung durch Antigen an der sensibilisierten Meerschweinchenlunge durch Sauerstoffmangel gehemmt wird, versucht man bis zum heutigen Tag den speziellen Charakter dieser Energieabhängigkeit aufzuklären. Mit den verschiedensten Versuchsanordnungen (Gewebeschnitte - isolierte Mastzellen), in künstlich produzierter Anoxie (Stickstoff, Helium), durch Enzyminhibitoren und Hemmstoffe des Zellmetabolismus wollte man zu einer Aufklärung dieses Problems kommen. Die Forschung der letzten Jahre, die sich hauptsächlich mit direkter Bestimmung von ATP, dem Energieträger der Zelle, und Messung des cAMP-Gehaltes vor, während oder nach Histaminfreisetzung beschäftigt, bestätigt nicht nur die älteren Befunde, sondern bringt auch neue Aspekte in das Gedankengebäude des energieerfordernden Histaminfreisetzungsprozesses aus Mastzellen.

1. Bedeutung des aeroben Stoffwechsels

Die Abhängigkeit der Freisetzung vom Sauerstoffangebot wurde nach PARROT (1942) in der Folgezeit von vielen Autoren wiederholt gezeigt.

Während die Versuche in der älteren Literatur in der Regel an Gewebepreparaten, wie zum Beispiel Rattenlungenschnitten (DIAMANT, 1961, 1962b), Meerschweinchenlungenschnitten (DIAMANT, 1962a, 1962b, 1962c; CHAKRAVARTY, 1962; DIAMANT und FREDHOLM, 1963) oder Rattenmesenterium (DIAMANT und UVNÄS, 1961) durchge-

führt wurden, geht die Tendenz der späteren Literatur dahin, reine Mastzellpopulationen zu verwenden, um möglichst alle nicht mastzellspezifischen Effekte auszuschließen (CHAKRAVARTY, 1968; DIAMANT, 1967; PETERSON und DIAMANT, 1971; PETERSON, 1974b und viele andere).

Anaerobe Versuchsbedingungen wurden dadurch geschaffen, daß die Zellen oder Gewebeschnitte in Stickstoff (DIAMANT und UVNÄS, 1961; DIAMANT, 1961; DIAMANT, 1962b und andere) oder Helium (CHAKRAVARTY, 1962) präinkubiert oder inkubiert wurden.

Es wurde im Endeffekt gezeigt, daß eine Histaminfreisetzung unter anoxischen Bedingungen und Glucosemangel praktisch unmöglich ist:

DIAMANT (1961) berichtete, daß nach 15 Minuten dauerndem Durchperlen des Inkubationsmediums von Rattenlungengewebe mit Stickstoff die Histaminfreisetzung durch *Ascaris suis*-Extrakt auf 9% der normalen Werte bei Glucose- und Sauerstoffanwesenheit herabgesetzt wurde und daß durch Zugabe von Sauerstoff wieder 60% Freisetzung der Normalwerte erreicht wurde.

DIAMANT und UVNÄS (1961) zeigten ebenfalls an Rattenlungenschnitten eine ca. 95%ige Hemmung der Histaminfreisetzung durch 48/80 nach 15 Minuten Präinkubation in Stickstoff und Weiterinkubation mit 48/80 in Anoxie.

Den gleichen Befund einer Hemmung der Histaminfreisetzung in Anoxie erhoben DIAMANT (1962a) an

sensibilisiertem Ratten- und Meerschweinchenlungen-
gewebe nach Inkubation mit Antigen, DIAMANT (1962b)
mit Antigen an sensibilisiertem Meerschweinchen- und
Rattenlungengewebe und mit 48/80 und Ascaris suis-
Extrakt an nicht sensibilisierter Rattenlunge.

CHAKRAVARTY (1962) berichtete, daß die durch Antigen
an sensibilisierter Meerschweinchenlunge hervorruf-
bare Histaminfreisetzung bei Reduktion des Sauerstoff-
druckes durch Heliumbeimischung abnimmt, bis
schließlich bei Erreichen eines kritischen Sauerstoff-
partialdruckes zwischen 7,5 und 52,5 Torr keine
Histaminfreisetzung mehr stattfindet.

Demgegenüber berichteten MONCAR und PERERA (1965),
daß isolierte Mastzellen nach Inkubation mit Antigen
oder 48/80 unter 7,5 Torr Sauerstoffpartialdruck
noch nicht wesentlich in ihrer Freisetzungsleistung
beeinträchtigt sind.

Noch im gleichen Jahr zeigten wiederum PERERA und
LONGAR (1965) eine Abhängigkeit der Hemmwirkung von
der Dauer der sauerstoff- und substratfreien Präin-
kubation der Mastzellen in Stickstoff. Während nach
15 Minuten Präinkubation die Histaminfreisetzung noch
unverändert stattfindet, ist sie nach 30 Minuten um
24% und nach 60 Minuten um 74% vermindert.

Diese beiden Autoren liefern damit erste Vorstellungen
vom zeitlichen Verlauf der Erschöpfung der Energie-
vorräte in den Mastzellen.

Auch CHAKRAVARTY und SÖLLESEN (1973) registrierten

noch einmal eine vollständige Hemmung der anaphylaktischen Histaminfreisetzung in Anoxie an Meer-schweinchenlunge.

So legte sich also trotz geringer Diskrepanzen bezüglich Ausmaß der Freisetzungshemmung und Dauer der anoxischen Präinkubation die Hypothese nahe, daß die Histaminfreisetzung auf die Energiebereitstellung aus einem intakten aeroben Stoffwechsel angewiesen sei.

Daraufhin wurden Versuche mit Entkopplern der oxydativen Phosphorylierung angestellt:

DIAMANT und UVNÄS (1961) hatten bereits die hemmende Wirkung von Dinitrophenol auf die Histaminfreisetzung durch 48/80 aus Rattenlungengewebe beschrieben.

Durch Präinkubation von isolierten Mastzellen mit Dinitrophenol in glucosefreiem Medium konnten auch MORAN et al. (1962) eine Hemmung der 48/80-induzierten Histaminfreisetzung und DIAMANT und KRÜGER (1967) eine Blockierung der ATP- und 48/80-Wirkung demonstrieren.

Die gleichen Ergebnisse an isolierten Mastzellen wurden mit Oligomycin erzielt:

DIAMANT und KRÜGER (1967) verwandten dabei ATP und 48/80 als Histaminliberatoren, JOHANSEN und CHAKRAVARTY (1972) nahmen 48/80, JOHANSEN und CHAKRAVARTY (1973) verwendeten 48/80 bei nicht sensibilisierten und Eialbumin als Antigen bei

Mastzellen von sensibilisierten Ratten.

Auch die Zugabe von Inhibitoren der Atmungskette übte einen Hemmeffekt auf die Freisetzungsreaktion aus.

Dies wurde an isolierten Mastzellen für Antimycin A von DIAMANT et al. (1974) für den anaphylaktischen Freisetzungsprozeß beschrieben.

DIAMANT und PETERSON (1971), PETERSON und DIAMANT (1971, 1974a) und PETERSON (1974a) fanden den gleichen Effekt mit ATP als Histaminliberator; der Hemmeffekt war gleichermaßen ausgeprägt, unabhängig davon, ob Glucose als Substrat anwesend war oder nicht.

PETERSON und DIAMANT (1972, 1973, 1974a), PETERSON (1974b) und DIAMANT et al. (1974) konnten den Hemmeffekt von Antimycin A auf 48/80-induzierte Histaminfreisetzung nur in Abwesenheit von Glucose demonstrieren.

Weitere Beweise für die Bedeutung des aeroben Stoffwechsels als Energielieferant für den Freisetzungsprozeß wurden durch Untersuchungen gesammelt, bei denen Substrate des Zitronensäurezyklus dem Inkubationsmedium zugefügt wurden.

Eine Stimulierbarkeit der Histaminfreisetzung unter Sauerstoff durch Succinat referierten DIAMANT (1962c) und DIAMANT und FREDHOLM (1963) für sensibilisierte Meerschweinchenlunge, nicht dagegen für sensibilisierte Rattenlunge oder nichtsensibilisierte Ratten-

lunge bei 48/80-Einwirkung, CHAKRAVARTY (1962) und CHAKRAVARTY und SÖRENSEN (1973) ebenfalls an sensibilisierter Meerschweinchenlunge.

Unter anoxischen Bedingungen konnte Succinat erwartungsgemäß keinen Effekt ausüben (CHAKRAVARTY, 1962; DIAMANT, 1962c; CHAKRAVARTY und SÖRENSEN, 1973).

Eine Hemmung der Histaminfreisetzung durch Inhibitoren des Zitronensäurezyklus zeigten CHAKRAVARTY (1962) mit Fluoroacetat, Arsenit und Malonat an sensibilisierter Meerschweinchenlunge, sowie CHAKRAVARTY und SÖRENSEN (1973) mit Malonat ebenfalls an sensibilisierter Meerschweinchenlunge.

2. Bedeutung des anaeroben Stoffwechsels

Die bisher dargestellten Befunde sprechen alle dafür, daß für den Histaminfreisetzungsprozess die Energiegewinnung durch einen intakten aeroben Stoffwechsel von essentieller Bedeutung ist. Man erkannte allerdings schon sehr früh, daß die Bereitstellung der für die Histaminfreisetzung erforderlichen Energie auch auf dem Wege der Substratphosphorylierung in der Glykolyse stattfinden kann.

DIAMANT (1961) beobachtete an Rattenlungengewebe, daß unter anaeroben Bedingungen in glucosefreiem Medium eine 90%ige Hemmung der Histaminfreisetzung durch *Ascaris suis*-Extrakt eintrat, die durch Zugabe von Glucose auf 20% reduziert werden konnte. Ebenfalls an der Rattenlunge, aber mit 48/80 konnten DIAMANT und UVNÄS (1961) demonstrieren, daß

15 Minuten Präinkubation mit Glucose die Hemmwirkung durch Anoxie aufhebt.

DIAMANT (1962c) berichtete, daß bei Anwesenheit von Glucose bei sensibilisierter Meerschweinchen- und Rattenlunge die anaphylaktische und bei Rattenlunge auch die 48/80-induzierte Histaminfreisetzung in Anoxie stattfindet.

Ein Ausbleiben der hemmenden Wirkung von Anoxie sowie von Natriumcyanid, einem Atmungsketteninhibitor, referierten MORAN et al. (1962) für gemischte, mit 48/80inkubierte Peritonealzellpopulationen. Aus den Aussagen der Autoren läßt sich leider nicht klären, ob das Inkubationsmedium glucosefrei war oder nicht.

PERERA und MONGAR (1965) konnten zeigen, daß eine Histaminfreisetzung durch Antigen oder 48/80 bei isolierten Mastzellen in Anoxie stattfinden kann, wenn Glucose während der gesamten Präinkubationsdauer in Stickstoff anwesend war, daß es aber auch möglich ist, eine durch Anoxie gehemmte Freisetzung durch wahlweise Glucose- oder Sauerstoffzufuhr kurz vor Zugabe des Histaminliberators völlig wiederherzustellen.

CHAKRAVARTY (1965) untersuchte mit einer Mikromethode die Glykolyseaktivität von isolierten Rattenperitonealmastzellen durch Messung der CO_2 -Entwicklung in einem Bikarbonatpuffer unter anaeroben Bedingungen und konnte zeigen, daß die aerobe und anaerobe Glykolyse einen großen Anteil am Stoff-

wechsel der Mastzellen ausmachen.

Eine Aufhebung der hemmenden Wirkung von Dinitrophenol auf die Histaminfreisetzung aus isolierten Mastzellen in Gegenwart von Glucose berichteten DIAMANT und IVNÄS (1961) und DIAMANT und KRÜGER (1967).

Bei Verwendung von Oligomycin als Inhibitor konnte Glucose den gleichen Effekt erzielen, wenn 48/80 als Histaminliberator verwendet wurde, nicht aber bei ATP (DIAMANT und KRÜGER, 1967).

Auch die Wirkung von Antimycin A konnte durch Glucosezufuhr antagonisiert werden, wenn die Histaminfreisetzung aus isolierten Mastzellen durch 48/80 induziert wurde (PETERSON und DIAMANT, 1972, 1973; PETERSON, 1974a, 1974b), nicht aber bei ATP (PETERSON und DIAMANT, 1974a) oder Antigen (DIAMANT et al., 1974) als Histaminliberator.

Die funktionelle Bedeutung der Glykolyse in Mastzellen läßt sich auch an einer gesteigerten Lactatbildung durch Glucose in Anwesenheit von Antimycin A als Hemmstoff der Atmungskette erkennen (PETERSON und DIAMANT, 1971, 1972, 1974a; PETERSON, 1974b), ebenso an der Hemmbarkeit der Glucoseeffekte durch den Glykolysehemmstoff Jodacetat (DIAMANT und PETERSON, 1970, 1971; DIAMANT et al., 1974).

3. Zusammenhang zwischen intrazellulärem ATP-Spiegel und Histaminfreisetzung

Nach den Ergebnissen der zitierten Arbeiten zur Energieabhängigkeit der Histaminfreisetzung ist es bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt unbestritten, daß Mastzellen, die sich im Energiedefizit befinden, in ihrer Freisetzungsleistung beeinträchtigt sind.

Die neuesten Untersuchungen zielen jetzt dahin, ATP in der Zelle zu messen und den intrazellulären ATP-Spiegel in Korrelation zu setzen zur Histaminfreisetzung.

DIAMANT (1967) zeigte, daß bei 5 bis 60 Minuten Inkubation von isolierten Mastzellen mit 48/80 in Glucosefreiem Medium unter Sauerstoff keine signifikante Verminderung des intrazellulären ATP-Bestandes stattfindet, obwohl Histamin freigesetzt wurde.

Auch PETERSON und DIAMANT (1973, 1974b) berichteten, daß Mastzellen mit intaktem Stoffwechsel keine Veränderung ihres ATP-Spiegels nach Einwirkung von 48/80 aufweisen.

Nach Ablauf einer anaphylaktischen Reaktion allerdings beobachteten DIAMANT et al. (1973) und KALININ und AUSEL (1974) einen Abfall des ATP-Spiegels in den Mastzellen.

Dieser Effekt konnte durch Gabe von Dinitrophenol anstelle von Antigen nachgeahmt werden (DIAMANT et al., 1973).

In substratfreiem Medium gehaltene Mastzellen zeigen nach Blockierung der oxydativen Phosphorylierung eine Reduktion ihres intrazellulären ATP-Spiegels nach Liberatorzugabe. Das Ausmaß der Histaminfreisetzung nimmt entsprechend der Reduktion des ATP-Gehaltes ab:

JOHANSEN und CHAKRAVARTY (1972) nahmen Oligomycin als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung und konnten zeigen, daß die Histaminfreisetzung durch 48/80 bis zu einem ATP-Gehalt von ca. 75% noch maximal stattfindet.

Dieser Befund wurde durch PETERSON (1974b), der Antimycin A verwendete, bestätigt. Bei weiterer Reduktion des intrazellulären ATP-Spiegels von 75 auf 5% steigt jedoch die Hemmung der Histaminfreisetzung von 10 auf 90% an.

Auch JOHANSEN und CHAKRAVARTY (1973) konnten, ebenfalls nach Vorbehandlung der Mastzellen mit Oligomycin, eine gute Korrelation zwischen Reduktion des ATP-Gehaltes und Hemmung der 48/80- sowie antigen-induzierten Histaminfreisetzung demonstrieren.

PETERSON und DIAMANT (1972) und PETERSON (1974a, 1974b) arbeiteten mit Antimycin A als Hemmstoff der Atmungskette. Sie berichteten, daß nach 2 bis 3 Minuten Präinkubation mit diesem Hemmstoff der intrazelluläre ATP-Spiegel auf ca. 30% der Norm absinkt, wobei eine vollständige Hemmung der 48/80-induzierten Histaminfreisetzung zu beobachten ist. Glucose- aber auch Mannosezufuhr führen dosisab-

hängig zu einer entsprechenden Steigerung des ATP-Spiegels und Aufhebung der Freisetzungshemmung. Letztgenannte Autoren folgern, daß die durch eine bestimmte 48/80-Konzentration freigesetzte Histaminmenge von der zum Zeitpunkt der Liberatorzugabe in der Mastzelle enthaltenen ATP-Menge bestimmt wird.

PETERSON und DIAMANT (1973, 1974b) erhoben die Befunde, daß mit Antimycin A vorbehandelte Mastzellen nach Inkubation mit 48/80 einen stärkeren Abfall ihres ATP-Gehaltes aufweisen als die Kontrollgruppe, die nicht mit dem Histaminliberator in Kontakt war. Ihre Schlußfolgerung ist, daß die 48/80-induzierte Histaminfreisetzung von einem gesteigerten ATP-Verbrauch in den Mastzellen begleitet wird.

In diesen Arbeiten wird außerdem noch einmal gezeigt, daß ein verminderter ATP-Gehalt mit einer Hemmung der Histaminfreisetzung einhergeht.

Insgesamt scheint also allgemein anerkannt zu werden, daß der intrazelluläre ATP-Spiegel von Bedeutung für das Ausmaß der Histaminfreisetzung ist.

4. Bedeutung des intrazellulären cAMP-Spiegels für den Histaminfreisetzungsprozeß

LICHTENSTEIN und MARGOLIS (1968) berichteten eine Hemmung der durch Antigen E ausgelösten Histaminfreisetzung aus sensibilisierten menschlichen Leukozyten nach Zufuhr von β -Mimetika (Isoproterenol, Adrenalin) oder Methylxanthinderivaten (Theophyllin, Coffein, Theobromin).

Aus der Arbeit von SUTHERLAND und ROBINSON (1966)

geht hervor, daß beide Substanzgruppen das zyklische 3',5'-Adenosinmonophosphatsystem beeinflussen, und zwar regen sie die Bildung von intrazellulärem cAMP an bzw. hemmen sie den Abbau von cAMP.

Die Katecholamine einerseits stimulieren das Enzym Adenylzyklase, welches in Anwesenheit von Mg^{++} -Ionen aus ATP die Bildung von cAMP und anorganischem Phosphat katalysiert (RALL und SUTHERLAND, 1962, zit. nach SUTHERLAND und ROBINSON, 1966). Das zyklische Nukleotid wird durch eine Phosphodiesterase inaktiviert, die es in 5'-AMP überführt.

Die Methylxanthinderivate andererseits sind kompetitive Hemmstoffe dieser Phosphodiesterase (BUTCHER und SUTHERLAND, 1962, zit. nach SUTHERLAND und ROBINSON, 1966).

Im Besitz dieser Kenntnisse postulieren LICHTENSTEIN und MARGOLIS (1968), daß cAMP bei der Regulation der allergischen Histaminfreisetzung eine Rolle spielt.

LICHTENSTEIN (1971) gelang es, an sensibilisierten Leukozyten die allergische Histaminfreisetzung in einen in zwei Schritten ablaufenden Prozeß aufzuteilen: Eine Aktivierung der Zellen als erste Stufe, die nur antigen- aber nicht Ca^{++} -abhängig ist und sehr schnell abläuft (weniger als zwei Minuten), die Histaminfreisetzung als zweiten Schritt, die nur dann einsetzt, wenn Ca^{++} -Ionen im Inkubationsmedium sind.

Unter Beibehaltung der gleichen Versuchsbedingungen konnten LICHTENSTEIN und De BERNARDO (1971) zeigen,

daß Isoproterenol, Prostaglandin E_1 , Theophyllin und Dibutyryl-cAMP den Freisetzungsprozeß hauptsächlich auf der Stufe der Zellaktivierung hemmen.

Dieser Befund, daß Substanzen, wie Isoproterenol und Theophyllin, von denen bekannt ist, daß sie den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen (SUTHERLAND und ROBINSON, 1966), bei der allergischen Histaminfreisetzung nicht den zweiten Schritt, die Histaminfreisetzung, direkt beeinflussen, sondern vorwiegend den ersten Vorgang, die Zellaktivierung hemmen, bekräftigt die Hypothese, daß cAMP als "second messenger" bei der allergischen Histaminfreisetzung wirkt.

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurden in der Folgezeit direkte Messungen von intrazellulärem markiertem cAMP vorgenommen. Ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels stand dabei immer in guter Korrelation zur Hemmung der allergischen Histaminfreisetzung.

BOURNE et al. (1971) benutzten Leukozyten von allergischen Patienten und Antigen E als Histaminliberator. Nach Zugabe von exogenem Histamin in das Inkubationsmedium konnten sie dosisabhängig einen intrazellulären cAMP-Anstieg und eine Hemmung der Histaminfreisetzung beobachten.

Dieser Befund wurde von BOURNE et al. (1972) bestätigt.

ORANGE et al. (1971) demonstrierten eine Hemmung der

Antigen E - induzierten Histaminfreisetzung aus sensibilisiertem menschlichem Lungengewebe bei erhöhtem cAMP-Gewebespiegel durch Zugabe von β -Mimetika (Isoproterenol, Adrenalin). Propranolol konnte diesen Hemmeffekt aufheben. Aminophyllin, ein Methylxanthinderivat, verstärkte noch den β -adrenergen Effekt.

α -adrenerge Stimulation durch Noradrenalin in Kombination mit Propranolol führte zu einer Verminderung des cAMP-Gewebespiegels und erhöhte die Freisetzungsrates.

Im folgenden Abschnitt sind weitere Autoren aufgeführt, die die gleiche Korrelation erhielten. Sie erhöhten mit verschiedenen Substanzen den cAMP-Spiegel unterschiedlicher Gewebe und beobachteten gleichzeitig eine Hemmung der allergischen Histaminfreisetzung:

SCHMUTZLER et al. (1973) arbeiteten mit sensibilisierter Meerschweinchenlunge und erhöhten die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch die Substanzen Dinatriumcromoglykat, Isoprenalin, Noradrenalin und Adrenalin.

BOURNE et al. (1972) behandelten Leukozyten von allergischen Patienten mit den β -Mimetika Isoproterenol, Adrenalin, Noradrenalin, Phenylephrin, gehemmt durch Propranolol, und mit den Prostaglandinen E_1 , E_2 , die ebenfalls als Aktivatoren der Adenylzyklase bekannt sind.

ROLF et al. (1974) arbeiteten mit Leukozyten von Asthmapatienten und den Substanzen Imidazol und

exogenem cAMP.

Daß die anaphylaktische Histaminfreisetzung selbst mit einer Reduktion des intrazellulären cAMP-Gehaltes einhergeht, berichteten ROLF et al. (1974) und KALINER und AUSTEN (1974).

Die Untersuchungen über Histaminfreisetzung aus Mastzellen durch den künstlichen Histaminliberator 48/80 weisen im Gegensatz zu denen über allergische Freisetzung einige Diskrepanzen auf:

Während ASSEM und RICHTER (1971) mit Isoproterenol und LÖFFLER et al. (1971) mit Dibutyryl-3'5'-cAMP, Prostaglandin E_1 , Reserpin, Theophyllin und anderen Substanzen eine Hemmung der 48/80-induzierten Histaminfreisetzung erzielen konnten, berichteten JOHNSON et al. (1974), daß durch Prostaglandin E_1 keine Verminderung der Freisetzung eintritt.

Nur in Anwesenheit von Papaverin, einem Phosphodiesteraseinhibitor, der selbst die Histaminfreisetzung kaum beeinflußt, erzielten sie eine partielle Freisetzungshemmung mit den Prostaglandinen E_2 und F_{2d} , mit Vasopressin und Angiotensin II.

Auch einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Isoproterenol, Adrenalin und Prostaglandine E_1 , E_2 , F_{2d} konnten sie in Abwesenheit von Papaverin nicht beobachten und stehen damit im Widerspruch zu allen früher zitierten Autoren.

Auch 48/80 selbst hatte keinerlei Einfluß auf den cAMP-Gehalt der Mastzellen, obwohl Histaminfreisetzung

stattfand. Dem steht die Aussage von GILLESPIE (1973) gegenüber, daß durch Inkubation mit 48/80 die intrazelluläre cAMP-Bildung vermindert wird, wobei die Histaminfreisetzung in stärkerem Maße stattfindet.

Aus diesen Befunden kann also zur Zeit noch nicht der Schluß gezogen werden, daß auch die 48/80-induzierte Histaminfreisetzung in enger Korrelation zum intrazellulären cAMP-Gehalt steht bzw. durch cAMP als second messenger vermittelt wird.

Z i e l d e r A r b e i t

Diese Arbeit geht von früheren Untersuchungen über die Energieabhängigkeit der Histaminfreisetzung aus und hat das Ziel, weitere Charakteristika dieses Energiebedarfs zu erarbeiten und einen Einblick in den Energiestoffwechsel der Mastzellen zu geben.

1. Um genauere Vorstellungen vom zeitlichen Verlauf der Erschöpfung der Energievorräte in den Mastzellen zu erhalten, bestimmen wir den Mindestzeitbedarf der sauerstoff- und substratfreien Präinkubation, nach der keine Histaminfreisetzung mehr erfolgt.

Die Ermittlung dieses Zeitpunktes ermöglicht unsere Meßanordnung, in der wir das Eintreten, die Konstanz und die Dauer der Anoxie exakt kontrollieren bzw. ermitteln können.

Um einen möglicherweise bevorzugten Stoffwechselweg in Mastzellen erkennen zu können, beobachten wir ihr Verhalten auf 48/80 unter verschiedenen Bedingungen bei Sauerstoffangebot und in Anoxie:

2. Unter Luftsauerstoff untersuchen wir die Beeinflussbarkeit der Histaminfreisetzung durch verschiedene exogen zugeführte Substrate.
3. Nach Bestätigung der in der Literatur beschriebenen Aufhebung einer durch Anoxie gehemmten Histaminfreisetzung durch Glucose- oder Sauerstoffzufuhr wird die Frage untersucht, ob auch andere Substrate als Glucose als Energielieferanten für den Frei-

setzungsprozeß dienen können.

4. Besonderes Gewicht soll der Bearbeitung der Frage zukommen, wieviel Zeit die Zellen benötigen, um nach Inkubation in Anoxie und bei Abwesenheit von exogenen Substraten aus dem angebotenen Sauerstoff oder der zugegebenen Glucose die Energievorräte so weit wieder aufzubauen, daß eine Histaminfreisetzung in Anoxie ermöglicht wird.

Gleichzeitig werden Untersuchungen vorgelegt, ob die Restitution der Histaminfreisetzung durch Sauerstoff von der zugeführten Sauerstoffmenge abhängt.

M e t h o d e n

1. Gewinnung der Peritonealzellen:

Die Peritonealzellen wurden, in Anlehnung an eine von UVNÄS und THON (1959) beschriebene Methode, aus der Peritonealhöhle von 110 bis 620 g schweren männlichen Sprague-Dawley Ratten gewonnen. Die Ratten wurden durch Überstreckung der Halswirbelsäule getötet und durch Eröffnung der Halsgefäße entblutet. Nach Entfernen des Felles über der Bauchmuskulatur wurden durch einen kleinen Schnitt durch die Bauchdecken 8 ml einer Pufferlösung folgender Zusammensetzung in die Peritonealhöhle gegeben:

Gepufferte Salzlösung (NaCl 154 mM , KCl 2,7 mM,

CaCl₂ 0,9 mM, 10% Sörensen

Phosphatpuffer pH 7,2)

Rinderserumalbumin 100 mg%

Heparin (Vetren^R) 10 mg%

Der End-pH dieser Spülflüssigkeit lag zwischen 7,05 und 7,18.

Nach Verschuß der Öffnung mit einer Klemme und vorsichtiger Massage des Abdomens über 90 Sekunden wurde die Peritonealspülflüssigkeit durch die gleiche Öffnung mit einer Pipette entnommen.

In der Regel ließen sich 5 bis 7 ml zurückgewinnen. Bis zum Versuchsbeginn wurde die Peritonealspülflüssigkeit eisgekühlt und verschlossen aufbewahrt; auch alle weiteren Vorbehandlungen (Mastzellisolation, Waschvorgänge) wurden bei 0 bis 4°C (eisgekühlte Lösungen, Kühlzentrifuge) vorgenommen.

2. Mastzellisolation:

Nach einer von P.H. COOPER und D.R. STANWORTH (1974) beschriebenen Methode wurden die Mastzellen aus der Peritonealspülflüssigkeit durch Zentrifugation über einer 30 %igen Ficoll-Lösung (Ficoll in gepufferter Salzlösung + 1 % Rinderserumalbumin) isoliert. Das Ficoll wurde nicht mit der nativen Peritonealspülflüssigkeit überschichtet, sondern die Peritonealzellen aus 10 ml Peritonealspülflüssigkeit wurden bei 750 x g 1 Minute lang sedimentiert und dann in ca. 1 ml "Waschlösung" (gepufferte Salzlösung + 100 mg % Rinderserumalbumin) resuspendiert. Je 2 ml der Ficoll-Lösung wurden in Zellulosenitratröhrchen (51 mm x 13 mm) gefüllt, mit 3 ml der Zellsuspension überschichtet und sofort 5 Minuten bei 150 x g in einer Kühlzentrifuge bei 0 - 4°C zentrifugiert. Nach der Sedimentation waren die Mastzellen als dichter Schleier im Ficoll, welches ursprünglich klar war, zu sehen. Die restlichen Zellen lagen als dichte rosa Zellage an der Grenzschicht. Zur Trennung der Zellen wurde das Röhrchen in einem Schneideapparat 2 mm unterhalb der Grenzfläche durchgeschnitten. Die überstehende gemischte Zellsuspension wurde verworfen, die Ficoll-Lösung mit den Mastzellen mit der oben beschriebenen Waschlösung herausgewaschen, in Plastikröhrchen auf 5 ml aufgefüllt und noch 3 mal gewaschen. Die Zellen wurden bei 750 x g sedimentiert und zwar 1 mal 2 Minuten lang und 2 mal 1 Minute lang. Die jeweiligen Überstände wurden verworfen. Nach dem letzten Reinigungsschritt wurden die Mastzellen auf das gewünschte Volumen für einen Versuch zum Sauerstoffverbrauch von isolierten

Mastzellen vor und nach 15 Minuten Anoxie aufgefüllt. Mit dieser Isolationsmethode erzielten wir eine Ausbeute von etwa 25 % der Mastzellen aus der insgesamt verwendeten Peritonealspülflüssigkeit bei einer Reinheit von mehr als 95 % Mastzellen. Einen Eindruck vom Effekt des Reinigungsprozesses geben folgende zwei Abbildungen 1a und b. :

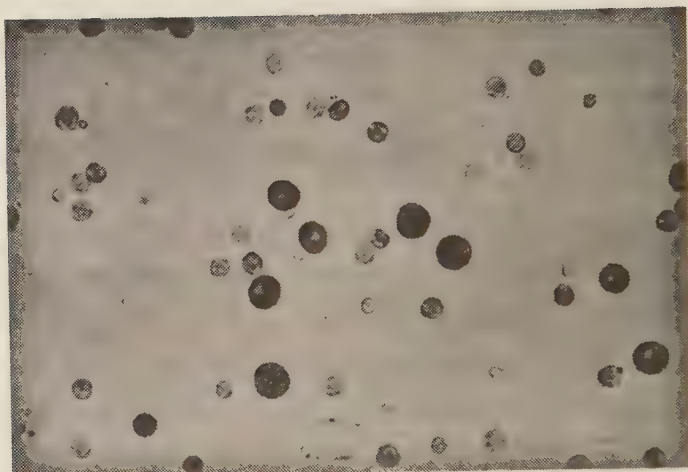


Abb. 1a. Gemischte Zellpopulation nach Entnahme aus der
Peritonealhöhle.



Abb. 1b. Isolierte Mastzellen nach dem Reinigungsprozeß.
Die Zellen wurden mit einer ursprünglich ver-
wendeten Isolationstechnik gewonnen, bei der
die Ausbeute an Mastzellen unter 10 % betrug.

3. Färben und Zählen der Mastzellen, Messen des Zelldurchmessers und Fotografieren der Zellen:

Das Zählen der Mastzellen erfolgte meist nach Anfärben mit Toluidinblau (pro ml unverdünnte Peritonealspülflüssigkeit kamen 0,1 ml einer Lösung von 50 mg% Toluidinblau in 4 %igem Formaldehyd) in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter einem Mikroskop der Firma Leitz, Typ Orthoplan. Zuletzt wurden auch ungefärbte Zellen gezählt, diese Ergebnisse aber hin und wieder mit gefärbten Präparaten überprüft.

Der Zelldurchmesser konnte mit einer in das Okular eingelegten Meßplatte bestimmt werden. Nach Eichung der "Okularmeßplatte" mit einem mit definierter Unterteilung versehenen Objektträger (2 mm-Skala in 200 Teilstriche à 10 μm unterteilt) konnte die in Skalenteilen abgelesene Zellgröße in μm umgerechnet werden. Die Ablesegenauigkeit betrug 0,1 bis 0,2 Skalenteile der Meßplatte im Okular, was 0,5 bis 1 μm entspricht. Es wurden jeweils 20 Zellen ausgemessen und daraus der arithmetische Mittelwert gebildet. Mit einer am Mikroskop angebrachten Fotografiereinrichtung wurden die gewünschten Zellbilder mittels einer Kleinbildkamera Typ Leica angefertigt. Als Film wurde ein Kodak Ektachrome (23 DIN Farbdiafilm) benutzt. Das Fotografieren erfolgte nach dem oben beschriebenen Anfärben der Mastzellen.

4. Histaminbestimmung:

Die Histaminbestimmung wurde entweder an aliquoten Mengen der aus mehreren Ratten gewonnenen Peritonealspülflüssigkeit oder an Zellsuspensionen aus den verschiedenen Versuchsanordnungen vorgenommen. Am Ende eines Versuches (bei 37°C) wurde das Reaktionsgefäß (Sauerstoffmeßgefäß) in Eiswasser ca. 5 Minuten abgekühlt zum Abstoppen der Histaminfreisetzungsreaktion. Nach schnellem Umgießen in ein vorgekühltes Zentrifugenröhrchen wurde die Zellsuspension in einer Christ-Kühlzentrifuge bei 0 bis 4°C 10 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Überstand und Sediment wurden nach Zugabe von 0,133 ml 70 %ige Perchlorsäure und Auffüllen ad 4,0 ml mit Aqua bidest zur späteren Histaminbestimmung bei -25°C eingefroren.

Die Ermittlung des Histamingehaltes erfolgte jeweils an ca. 30 bis 60 Proben gleichzeitig (etwa 1 bis 14 Tage nach dem jeweiligen Versuchstag) nach der von SHORE et al. (1959) beschriebenen Methode, einer fluorometrischen Histaminbestimmungsmethode. Die Messung erfolgte an einem Spektralfluorometer der Firma Zeiß. Eine Abänderung der SHORE'schen Methode wurde von uns vorgenommen: Wir ließen den Schritt der alkalischen Waschung der Butanolphase zur Histidinextraktion weg, da mehrmalige kontrollen mit und ohne Histidinextraktionen an gleichen Proben keine unterschiedlichen Ergebnisse ergaben. Zur Ermittlung des Histamingehaltes in den Proben führten wir bei jeder Extraktion 4 interne Standards mit. Diese internen Standards besaßen die gleiche Lösungszusammensetzung wie die Mastzellproben, enthielten nur statt Zellen eine definierte Menge an Histamin.

Als Stammlösung für die Standards wurde Histamindihydrochlorid (Merck) verwendet. Der Meßbereich der internen Eichkurve wurde durch Variation der Histaminkonzentrationen in den internen Standards jeweils den erwarteten Histamingehalten in den Proben angepaßt. Der Histamingehalt unserer Proben lag zwischen 0,1 und 1,25 µg Histamin pro ml. Die interne Standardeichkurve war in dem gesamten Bereich linear. Mit Hilfe externer Standards, bei denen Histamin unmittelbar in die Kondensationsreaktion gegeben wurde, errechnete sich eine Ausbeute von $70 \pm 9 \%$ ($n = 20$). Sämtliche Angaben zur Histaminmenge beziehen sich auf die Menge an Histamin als Base.

5. Versuchsbeschreibungen

a) Vorbereitung der Peritonealzellen zur Inkubation

Zum Entfernen von Heparin und anderer eventuell aus der Peritonealhöhle mitgeführter Substanzen wurden die Peritonealzellen mit der eingangs beschriebenen gepufferten Salzlösung + 100 mg% Rinderserumalbumin, jedoch ohne Heparin, 2 mal gewaschen und in der gleichen Lösung ohne Heparin resuspendiert.

Die Zellen wurden bei 1400 U/min in einer Christ-Kühlzentrifuge (4°C) sedimentiert. Puffer und verwendete Zentrifugenröhrchen waren eisgekühlt.

Der Mastzell- und damit Histaminverlust bei dieser Prozedur war vernachlässigbar gering (vgl. Ergebnisse 2d), ebenso konnte keine gesteigerte Histamin-Spontanfreisetzung beobachtet werden.

b) Erstellung der Zeitwirkungskurve für Substanz 48/80

Der Zeitverlauf der Histaminfreisetzung durch 48/80 wurde nach einer von Bloom et al. (1967) beschriebenen Methode ermittelt. Als Reaktionstemperatur wählten wir die Temperatur von 37°C , die bei allen unseren anderen Versuchen beibehalten wurde. Die verwendete 48/80-Dosis von $0,8\mu\text{g}$ pro ml Inkubat war, wie in der später beschriebenen Dosiswirkungskurve noch gezeigt wird, eine maximal freisetzende Dosis.

Pro Reaktionsansatz wurden 2 ml einer Suspension gewaschener Zellen aus der Peritonealspülflüssigkeit in silikonierten Zentrifugenröhrchen 15 min in einem 37°C Wasserbad vorinkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml 48/80-Lösung zu dem Reaktionsansatz von 2 ml und dessen Einwirkung zwischen 7 Sekunden und 20 Minuten wurde die Histaminfreisetzungsreaktion jeweils zum betreffenden Zeitpunkt durch Zugabe von 7,8 ml eiskalter Pufferlösung und Abkühlen des Zentrifugenröhrchens in Eiswasser abgestoppt. Die Versuche wurden in Doppelansätzen durchgeführt. Bei den Versuchen, in denen wir den Einfluss von Glucose (5 mM Endkonzentration) auf die Histaminfreisetzung zu verschiedenen Einwirkzeiten von 48/80 untersuchten, wurde das Substrat jeweils vor Inkubationsbeginn in einem Volumen von 10 μl zugegeben. Auch diese Versuchsreihe wurde in Doppelansätzen durchgeführt. Als Kontrollansatz hatten wir für jeden Zeitpunkt eine Probe, die statt 48/80 0,2 ml 0,9 % NaCl-Lösung zugesetzt bekam und erhielten so die Histamin-spontanfreisetzung über die Zeit. Die Histaminfreisetzung zum Zeitpunkt 0 ermittelten wir, indem wir Verdünnung

und Abkühlung des Reaktionsansatzes vor der 48/80 - bzw. NaCl-Zugabe vornehmen.

Nach Abkühlen (ca. 2 min) der Proben wurden sie in einer Kühlzentrifuge bei 0-4°C (10 min Zentrifugation bei 2.500 U/min) in Überstand und Sediment getrennt. Zur Histaminbestimmung wurde das Sediment ganz, von den 10 ml Überstand nur 2 ml genommen. Der Faktor 5 wurde bei der späteren Histaminberechnung berücksichtigt.

c) Erstellung der Dosiswirkungskurve für Substanz 48/80

Reaktionsansätze von 2 ml einer Suspension gewaschener Zellen aus der Peritonealspülflüssigkeit oder auch native Peritonealspülflüssigkeit mit Heparin wurden in silikonierten Zentrifugenröhrchen in einem Wasserbad von 37°C bei Zimmerluft (ca. 150 Torr Sauerstoff) 15 min vorinkubiert. 0,2 ml 48/80-Lösung wurden in Endkonzentrationen zwischen 0,025 und 1,6 µg pro ml Reaktionsansatz zugegeben und damit 10 min weiterinkubiert. Danach wurden alle Proben ca. 2 min in Eiswasser abgekühlt, in der Kühlzentrifuge in Überstand und Sediment getrennt und für die spätere Histaminbestimmung entsprechend vorbereitet. (s.o.)

Bei Versuchen, in denen gleichzeitig die entsprechende Degranulationsrate der Mastzellen bestimmt werden sollte, wurden nach Abkühlen 0,1 ml vom Reaktionsansatz abgenommen und intakte sowie degranulierte Mastzellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt.

In den Versuchsreihen, in denen verschiedene Substrat-effekte auf die Histaminfreisetzung untersucht werden sollten, wurde das jeweilige Substrat in Volumina von 10 μ l direkt vor dem Praeinkubationsbeginn zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben ausgeführt.

d) Histaminfreisetzungsversuche unter anoxischen Bedingungen

Die Versuche zur Histaminfreisetzung in Anoxie wurden in einem temperierten Inkubationsgefäß von 1,8 ml Volumen bei 37°C durchgeführt. Bei dieser Inkubation war eine gleichzeitige Sauerstoffmessung möglich. Zur Abkürzung der Versuchsdauer wurden die einzelnen Zellproben (gewaschene Zellen aus der Peritonealspülflüssigkeit ohne exogenes Substrat) vor Versuchsbeginn in einem silikonierten Erlenmeyer-Kolben bei 37°C 10 min mit Stickstoff begast. Damit erreichten wir eine Reduktion des aktuellen Sauerstoffpartialdruckes in der Probe von ca. 150 Torr O₂ auf 30 - 50 Torr O₂. Nach Umgießen in das Inkubationsgefäß und luftdichtem Verschießen desselben wurde der Sauerstoffverbrauch polarographisch mit dem Meßgerät der Firma Eschweiler, Kiel mittels einer Mehrdraht-Sauerstoffelektrode bestimmt und mit einem Rikadenki-Schreiber registriert. Aus der Abnahme des kontinuierlich registrierten Sauerstoffpartialdruckes in dem geschlossenen Inkubationsgefäß von 1,8 ml Inhalt wurde unter Verwendung eines Bunsenschen Absorptionskoeffizienten von 0,024 die Menge des verbrauchten Sauerstoffs berechnet.

Die Eichung der Meßeinrichtung erfolgte mit nachgereinigtem Stickstoff und Luft.

Durch unsere Methode hatten wir genau kontrollierbare Bedingungen für die verschiedenen Versuche in Anoxie geschaffen: Der Zeitpunkt des Eintretens der Anoxie, Anoxiedauer, Konstanz des Anoxiezustandes der Zellen, Effekte bei Zugabe von Substrat, Histaminliberator oder sauerstoffgesättigter Pufferlösung wurden genau registriert und aufgezeichnet.

Die Substrate, wie z.B. Glucose, Fructose, Succinat usw. wurden mittels einer Hamilton-Mikroliter-Spritze in Volumina von 10 μ l, der Histaminliberator 48/80 in 5 μ l zugegeben (1,1 μ g pro ml Inkubat).

Die dadurch bewirkte Verdünnung des Gesamtvolumens der Zellsuspension konnte bei diesen kleinen Verdünnungsfaktoren bei späteren Berechnungen vernachlässigt werden. Die Sauerstoffeinschleppung lag bei diesen Zugaben meist unterhalb der Nachweisgrenze unserer Meßanordnung. Falls ein Anstieg des aktuellen Sauerstoffpartialdruckes in unserer Zellprobe registriert wurde, so lag er in keinem Fall über 1 Torr. Alle Zugabelösungen wurden vor Gebrauch auf 37°C gebracht.

Am Versuchsende wurde das noch verschlossene Reaktionsgefäß in Eiswasser abgekühlt und wie in Methoden 4. beschrieben, zur späteren Histaminbestimmung weiterbehandelt.

6. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die angegebenen Mittelwerte stellen arithmetische Mittel von Meßergebnissen dar. Als Maß für die Streuung dient, wenn nicht anders vermerkt, die einfache Standardabweichung (SD).

Die Regressionsgeraden wurden nach der Methode der kleinsten quadratischen Abweichungen berechnet. Alle Berechnungen erfolgten maschinell auf einem Wang "Series 700" -Rechner nach Programmen des pharmakologischen Institutes.

Abkürzungen:

- n = Anzahl der Versuche bzw. Präparationen
- b = Regressionskoeffizient
- a = Schnittpunkt mit der y-Achse
- r = Korrelationskoeffizient

Die Beurteilung des Korrelationskoeffizienten auf Verschiedenheit gegenüber Null wurde mit Hilfe einer Tabelle aus: "Wissenschaftliche Tabellen" von Documenta Geigy, 7. Auflage, 1968, Seite 61 durchgeführt.

7. Chemikalien:

NaCl pro analysi (p.a.); KCl p.a.; CaCl_2 -2-hydrat p.a.;
Histamindihydrochlorid; HCl-Titrisol; NaOH-Titrisol;
Perchlorsäure 70 % p.a.; Heptan (99 % rein); n-Butanol p.a.;
Methanol p.a.; D-Glucose; D-Fructose; Kaliumdihydrogen-
phosphat p.a.; Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat p.a.;

von Firma Merck, Darmstadt

Adenosintriphosphat (als Na-Salz);

ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (Reinheitsgrad I)

von Firma Boehringer, Mannheim

Rinderserumalbumin (elektrophoretischer Reinheitsgrad 100 %)

von Firma Behringwerke AG, Marburg

Heparin-Natrium (Vetren^(R))

von Firma Promonta, Hamburg

Ficoll (Molekulargewicht 400 000, > 99 % rein, Rest NaCl)

von Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden

Toluidinblau p.a.

von Firma J.D. Riedel - E. de Haën AG, Berlin

OPT-Reagenz (Molekulargewicht 134,1)

von Firma Californian Corporation for Biochemical
Research

Bernsteinsäure (als Na-Salz), reinst

von Firma Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

Substanz 48/80 (Moisture 5,7 %)

von Firma Burroughs Wellcome & CO., USA, Inc.

Tuckahoe N.Y.

E_r_g_e_b_n_i_s_s_e

1. Anfärben der Mastzellen

Das Anfärben der Mastzellen mit Toluidinblau (ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration) kontrollierten wir mikroskopisch und machten dabei verschiedene Beobachtungen, die für nicht-isolierte und isolierte Mastzellen gleichartig waren.

(Unsere Ergebnisse stimmen gut mit denen von Johnson und Moran (1974) überein.)

- a) Das Ausmaß der Farbaufnahme ist abhängig von der Temperatur der Zellsuspension. Wurde die Mastzellsuspension in Eiswasser (0°C) mit Toluidinblau inkubiert, so fand keine sichtbare Farbaufnahme statt. Bei allmählichem Erwärmen auf Zimmertemperatur ($25 - 30^{\circ}\text{C}$) konnten wir unter laufender mikroskopischer Beobachtung eine zunehmende Farbintensität in den Mastzellen feststellen ($n = 2$).
 - b) Die Geschwindigkeit der Farbaufnahme bei Zimmertemperatur ist für isolierte Mastzellen und Mastzellen aus Peritonealspülflüssigkeit gleich, unterscheidet sich aber von der mit 48/80 ($1,6 - 4,8 \mu\text{g/ml}$) präinkubierten Mastzellen. Isolierte und nicht isolierte Mastzellen zeigten nach ca. 3 min erste sichtbare Farbaufnahme und erreichten zwischen 40 und 60 min ihr Färbemaximum ($n = 5$).
- Mit 48/80 präinkubierte Mastzellen waren innerhalb von 15 sec schon leicht angefärbt und zeigten bereits nach 30 - 60 sec ihr Färbemaximum ($n = 4$).

Im Stadium der geringeren Farbaufnahme (5-20 min bzw. 15 sec ohne bzw. mit 48/80) ließen sich sehr gut die mit dem Lichtmikroskop sichtbaren Mastzellstrukturen wie Grana, Zytoplasma und Zellmembran unterscheiden.

Bei maximaler Farbaufnahme waren die Mastzellen nur noch als schwarzblaue Flecken, ohne erkennbare Zellstrukturen, von den anderen Zelltypen in der Peritonealflüssigkeit zu unterscheiden.

2. Eigenschaften der Mastzellen aus Peritonealspülflüssigkeit

a) Mastzellgehalt der Peritonealspülflüssigkeit

Die mit unserer Entnahmetechnik gewonnene Peritonealspülflüssigkeit hatte einen Gesamtzellgehalt (einschließlich Mastzellen) von $3,56 \pm 1,74 \times 10^6$ Peritonealzellen pro ml ($n = 26$). Pro Ratte ergab dies $16,89 \pm 9,7 \times 10^6$ Zellen. Diese Gesamtzellmenge zeigte, im Gegensatz zur Mastzellmenge, keine Abhängigkeit vom Rattengewicht. Der durchschnittliche Mastzellgehalt betrug $6,3 \pm 3,7 \%$ ($n = 26$).

Abb. 2 zeigt, daß die Zahl der in der Peritonealspülflüssigkeit enthaltenen Mastzellen mit dem Rattengewicht positiv korreliert ($p < 0,001$).

Ein mittlerer Mastzellgehalt in der Peritonealspülflüssigkeit ist bei Ratten der mittleren Gewichtsklasse anzutreffen und liegt bei $8,43 \pm 3,41 \times 10^5$ Mastzellen pro Ratte.

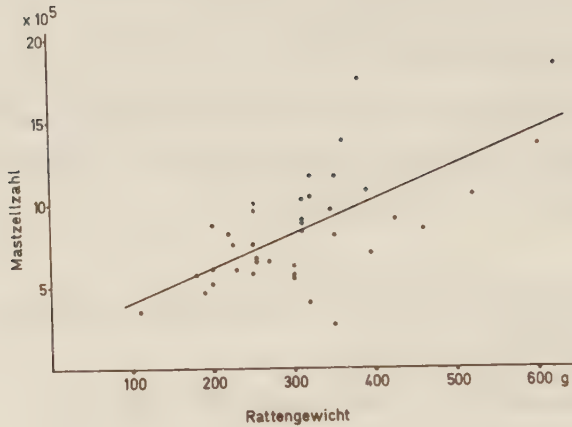


Abb. 2. Abhängigkeit der in der Peritonealspülflüssigkeit enthaltenen Mastzellzahl vom Rattengewicht.

Nach Eingabe von 8 ml Pufferlösung in die Peritonealhöhle wurden pro Tier etwa 5 bis 7 ml Flüssigkeit zurückgewonnen.

(a 1,96; b 0,02; r 0,65; n 39; $p < 0,001$)

b) Zelldurchmesser

Abb. 3. läßt erkennen, daß mit Zunahme des Rattengewichtes auch eine Zunahme des Mastzelldurchmessers verbunden ist ($p < 0,001$). Die übrige Zellpopulation der Peritonealspülflüssigkeit hingegen zeigt eine geringe Größenabnahme bei steigendem Rattengewicht ($p < 0,05$).

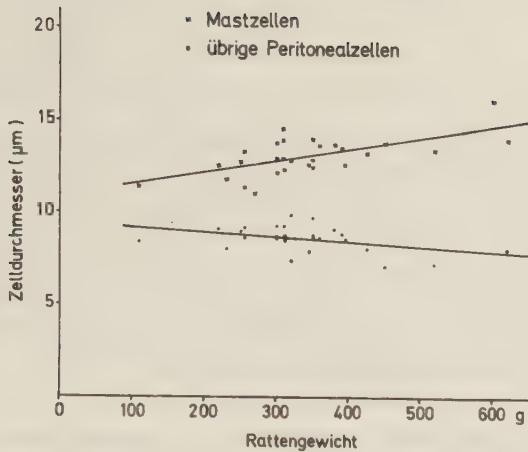


Abb. 3. Durchmesser von Mastzellen und anderen Zellen in der Peritonealspülflüssigkeit in Abhängigkeit vom Rattengewicht

Die Zelldurchmesser wurden mikroskopisch mit einer im Okular befindlichen geeichten Meßplatte bestimmt. Jeweils 20 Zellen wurden ausgemessen und daraus das arithmetische Mittel gebildet.

(Mastzellen: a 10,93; b 0,006; r 0,673; n 28;
 $p < 0,001$

übrige Zellen: a 9,56; b 0,003; r -0,404; n 26;
 $p < 0,05$)

Unsere Ergebnisse stammen von männlichen Ratten zwischen 110 und 620 g. Der kleinste Mastzelldurchmesser von 11,4 µm war bei einer Ratte von 110 g zu finden, der größte Durchmesser von 16,1 µm bei einer 600 g Ratte.

Der mittlere Mastzelldurchmesser von $13,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$ kann in etwa den 300 g-Ratten zugeordnet werden. Hier ist der Mastzelldurchmesser ca. 50 % größer als der Durchmesser der übrigen Zellen (ca. $9 \mu\text{m}$). Aus der Abbildung ist weiterhin abzulesen, daß mit steigendem Rattengewicht der Abstand zwischen Peritonealzell- und Mastzelldurchmesser größer wird. Dieser Faktor könnte für die Mastzellisolation durch Dichtegradientenzentrifugation von Bedeutung sein. Mit steigendem Rattengewicht wird sich wahrscheinlich die Mastzellausbeute und -Reinheit verbessern.

Zum Vergleich haben wir in der folgenden Tabelle 1. die Durchmesser von Mastzellen denen von Rattenerythrozyten und Rattenleberzellen gegenübergestellt.

Tab. 1. Zelldurchmesser von Mastzellen, Erythrozyten und isolierten Leberzellen der Ratte

Zellart	Zelldurchmesser (μm)			Anzahl der Präparationen
	Mittelwert	Maximalwert	Minimalwert	
Rattenperitonealmastzellen	$13,1 \pm 1,0$	16,1	11,0	28
Rattenerythrocyten	$6,2 \pm 0,3$	6,8	5,8	9
Rattenleberzellen	$27,2 \pm 0,1$	27,3	27,1	3

Mastzellen und Erythrocyten wurden in der Peritonealspülflüssigkeit beurteilt. Die Leberzellen befanden sich in

der in Methoden im Abschnitt 1. beschriebenen Spülflüssigkeit. Die Zelldurchmesser wurden wie in Abb 3. beschrieben bestimmt. Angabe der Zellgröße in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$.

c) Mastzellmorphologie

Zur Mastzellmorphologie konnten wir an unterschiedlich schweren Ratten auch verschiedene Beobachtungen machen, die wir durch folgende Mikrofotografien dokumentieren möchten.

Abb. 4a. stellt Peritonealzellen einer 220 g schweren Ratte dar und zeigt, daß alle Mastzellen gleichmäßig rund sind. Zwischen den verschiedenen Mastzelldurchmessern besteht nur ein sehr geringer Unterschied. Die Differenz zwischen der Größe der Mastzellen und den übrigen Zellen der Peritonealspülflüssigkeit ist sehr gering.

Abb. 4b. zeigt Zellen aus der Peritonealspülflüssigkeit einer 620 g schweren Ratte. Hier ist zu sehen, daß die Mastzellformen stärker variieren. Zu den runden Mastzellen kommt ein geringer Prozentsatz (ca. 10 %) an polymorphen Mastzellen hinzu. (Die Beobachtung einer Zunahme von abnormen Mastzellformen mit steigendem Rattengewicht wurde bereits von PADAWER und GORDON (1956) berichtet). Der Größenunterschied zwischen den kleinsten und größten Mastzellen ist sehr viel größer als in Abb. 4a. Auch ist die Differenz zwischen den Durchmessern der Mastzellen und der übrigen Zellen deutlicher ausgeprägt.

Diese beiden Fotografien können außerdem zur Illustration der in Abb. 3. gemachten Aussagen angesehen werden.

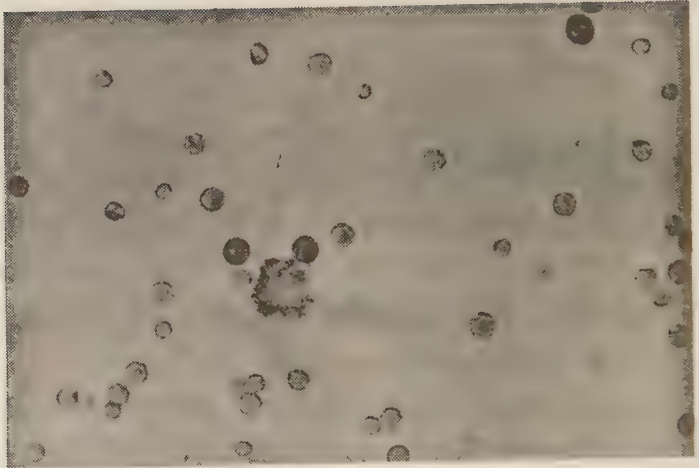


Abb. 4a.

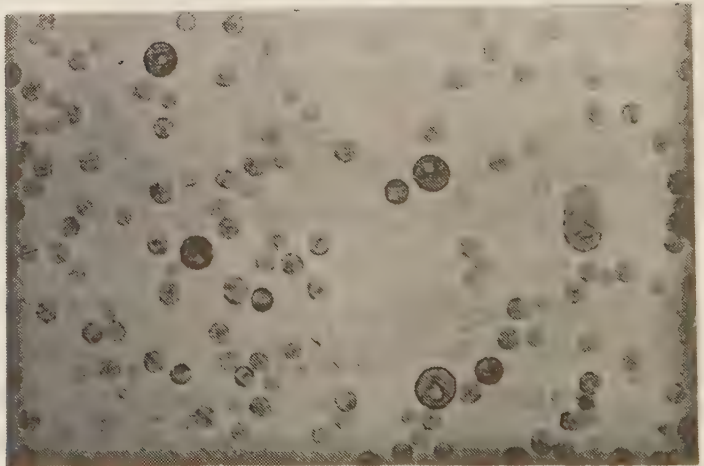


Abb. 4b.

Gegenüberstellung von gemischten Peritoneal-
zellen von Ratten mit unterschiedlichem Gewicht

Peritonealzellen einer Ratte von 220 g (a) bzw. 620 g (b) wurden 40 min lang mit Toluidinblau angefärbt. Danach wurden die beiden Mikrofotografien bei gleicher Mikroskopeinstellung und Belichtungszeit aufgenommen. Die Zellen sind in 460-facher Vergrößerung dargestellt.

d) Histamingehalt der Mastzellen

Der auf die Mastzellzahl bezogene Histamingehalt in der Peritonealflüssigkeit betrug im Durchschnitt $1,81 \pm 0,45 \mu\text{g}$ Histamin pro 10^5 Mastzellen ($n = 29$). Pro Ratte ergab dies einen durchschnittlichen Histamingehalt von $16,42 \pm 10,72 \mu\text{g}$ Histamin in der gewonnenen Peritonealspülflüssigkeit.

Durch stichprobenhafte Bestimmungen der Histaminmengen in Waschüberständen konnten wir ausschließen, daß während des Waschvorganges ein größerer Prozentsatz an Mastzellen und infolgedessen an Histamin verloren ging. Der durchschnittliche Histaminverlust pro Ratte betrug $0,28 \mu\text{g}$ Histamin bzw. $0,03 \mu\text{g}$ Histamin pro 10^5 Mastzellen. Die Streuung im Histamingehalt der Mastzellen bzw. der Spülflüssigkeit läßt sich dadurch erklären, daß wir keine Mastzellpräparationen aus einer konstanten Rattengewichtsklasse verwendeten, sondern Histaminbestimmungen von Mastzellen aus Ratten zwischen 110 und 620 g Körpergewicht durchführten. Die nächsten Abbildungen sollen obige Ergebnisse veranschaulichen.

Abb. 5. zeigt, daß mit steigendem Rattengewicht der Histamingehalt in der Peritonealspülflüssigkeit ansteigt ($p < 0,01$). Der niedrigste Histaminwert ($4,71 \mu\text{g}$) ist einer Ratte von 110 g zuzuordnen, die höchsten ($55,83 \mu\text{g}$; $41,41 \mu\text{g}$) Ratten von 380 und 620 g. Mittlere Histaminwerte um $16 \mu\text{g}$ sind in der mittleren Gewichtsklasse zu finden.

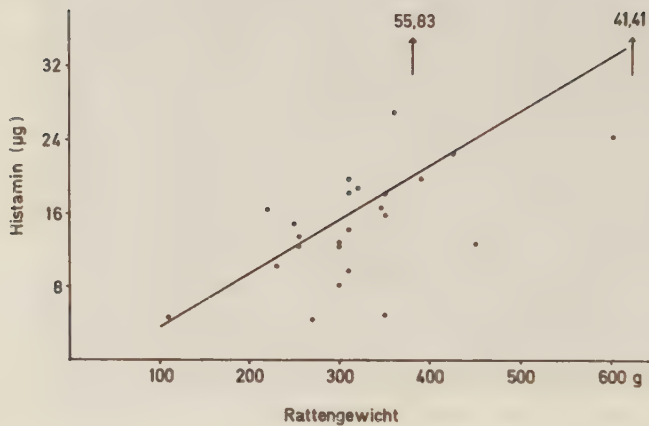


Abb. 5. Histaminmenge in der Peritonealspülflüssigkeit der Ratte in Abhängigkeit vom Rattengewicht

Nach sorgfältigem Aufschütteln der aus mehreren Ratten gleichen Gewichtes gewonnenen Peritoneal-spülflüssigkeit wurde der Histamingehalt in einem Aliquot fluorometrisch bestimmt und auf die aus einer Ratte gewonnenen Spülflüssigkeit berechnet. ($a=2,32$; $b\ 0,06$; $r\ 0,569$; $n\ 26$; $p<0,01$)

Abb. 6. stellt eine Korrelation zwischen Histamingehalt pro Mastzelle und Mastzelldurchmesser dar. Auch hier ist mit einer Zunahme des Mastzelldurchmessers ein Anstieg des Histamingehaltes pro Mastzelle verbunden ($p<0,05$).

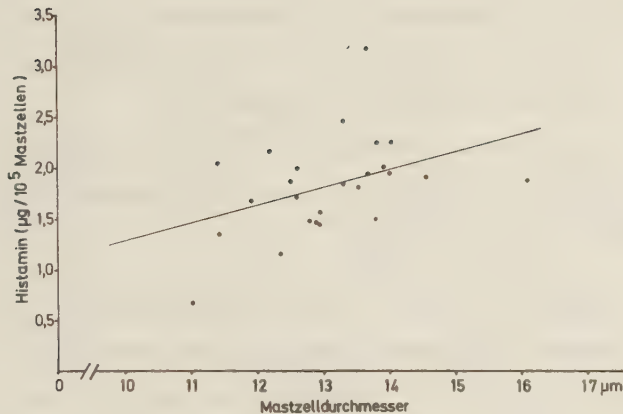


Abb. 6. Histamingehalt der Mastzellen aus Rattenperitonealspülflüssigkeit in Abhängigkeit von ihrem Durchmesser

Die Ermittlung der Histaminmenge erfolgte wie in Abb. 5. beschrieben. Der Mastzellendurchmesser wurde wie in Abb. 3. erläutert bestimmt.
(a -0,45; b 0,17; r 0,403; n 25; $p < 0,05$)

3. Wirkung von Substanz 48/80 auf Mastzellen aus Peritonealspülflüssigkeit

Die Wirkung von Compound 48/80 auf Mastzellen wurde anhand von verschiedenen Kriterien geprüft:

- a) Wir untersuchten die Abhängigkeit der Histaminfreisetzung von der Dauer der 48/80-Anwesenheit in substratfreier Mastzellsuspension und deren Beeinflussung durch Glucose. - Zeitwirkungskurve von 48/80 mit und ohne Glucose - (s. Abb. 7.).

- b) Wir ermittelten mikroskopisch die Degranulationsrate der Mastzellen nach Einwirkung von verschiedenen Liberatorkonzentrationen und bestimmten die dazugehörigen freigesetzten Histaminmengen ($n = 1$; s. Tab.2.).
- c) Wir erstellten für 48/80 unter verschiedenen Bedingungen Dosiswirkungskurven. (s. Abb. 8.).
- d) Wir untersuchten verschiedene Substrateffekte auf die Histaminfreisetzung durch 48/80 in Gegenwart von Sauerstoff. (s. Abb. 9.).

zu a) In Abb. 7. sind Spontanfreisetzung und die durch 48/80 bewirkte Histaminfreisetzung nach verschieden langer Einwirkung von 48/80 in Reaktionsansätzen mit und ohne Glucose dargestellt. Die Spontanfreisetzungswerte zwischen 0 und 20 min liegen im Mittelwert bei 18 % bzw. mit Glucose bei 16 %. Die Histaminfreisetzung durch 48/80 beginnt in den ersten Sekunden nach Zugabe des Liberators und erreicht bereits nach 7 Sekunden fast maximale Werte (83 % bzw. 82 % mit Glucose). Inkubation bis zu 20 min verbessert die Freisetzungsrates nicht mehr. Die Freisetzung zum Zeitpunkt 0 entspricht praktisch dem Kontrollwert bzw. der Spontanfreisetzung.

zu b) Bei mikroskopischer Kontrolle der Mastzellen nach Inkubation mit 48/80 zwischen 0,2 und 4,8 $\mu\text{g/ml}$ Reaktionsansatz konnten wir mit ansteigender Liberatordosis auch ein Zunehmen der Degranulationsrate bei den Mastzellen beobachten. Jedoch zeigte sich auch bei höherer 48/80 Konzentration stets eine geringe Anzahl von Mastzellen, die an ihrer Oberfläche und in ihrer Zellstruktur völlig unver-

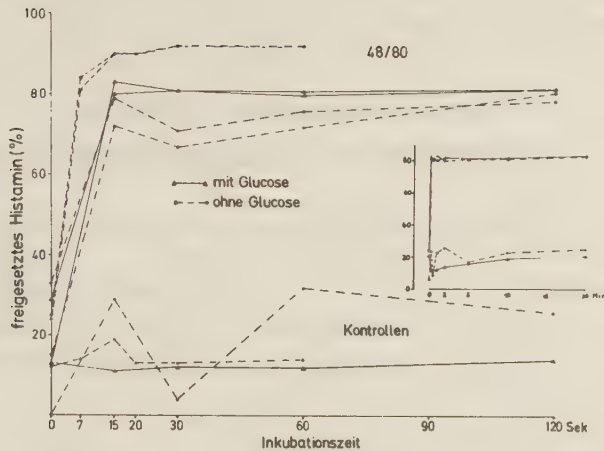


Abb. 7. Zeitverlauf der Histaminfreisetzung durch Substanz 48/80 mit und ohne Glucose im Inkubationsmedium

Gewaschene Zellen aus der Peritonealspülflüssigkeit wurden mit Glucose (5 mM Endkonzentration) bzw. glucosefrei bei 37°C unter Luftsauerstoff inkubiert. Nach 15-minütiger Präinkubation erfolgte die Zugabe von 0,8 µg 48/80 pro ml Inkubat, bzw. von 0,9 % NaCl-Lösung in den Kontrollansätzen. Die Inkubationszeit bis zum Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von eisgekühlter Pufferlösung lag zwischen 7 Sekunden und 20 Minuten. - In dem in die Abbildung eingefügten Diagramm sind gemittelte Werte über einen Inkubationszeitraum von 20 Minuten dargestellt.

ändert waren und anscheinend nicht von dem Liberator tangiert wurden. Ob sie auch nicht am Histaminfreisetzungsprozeß teilnehmen, wurde nicht geklärt. Die gleichzeitig bestimmten Histaminwerte veränderten sich gleichsinnig, zeigten aber eine deutliche Diskrepanz zur Degranulationsrate, wobei

die gemessenen Werte der Histaminfreisetzung höher lagen, als nach der Degranulationsrate zu erwarten war.

Tabelle 2. soll dies veranschaulichen:

Tab. 2. Vergleich der Degranulationsrate von
Peritonealmastzellen mit der Histaminfreisetzung

48/80 µg/ml Reaktions- ansatz	µg Histamin pro 10 ⁵ Mastzellen		Histamin- frei- setzung (%)	Degranu- lations- rate (%)
	Gesamt	Überstand		
0	1,33	0,01	1	0
0,2	0,56	0,43	77	30
0,4	0,49	0,43	88	38
0,8	0,67	0,64	95	52
1,6	0,57	0,51	89	76
4,8	1,35	1,32	98	74

Gewaschene Zellen aus Peritonealspülflüssigkeit ohne Substratzusatz wurden unter Luftsauerstoff 15 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Nach Zugabe von Substanz 48/80 in Konzentrationen zwischen 0,2 und 4,8 µg/ml im Ansatz bzw. 0,9 % NaCl-Lösung im Kontrollansatz wurde 5 Minuten lang weiterinkubiert und danach die Reaktion abgestoppt. In jeder Probe wurde der Anteil der degranulierten Mastzellen in % vom Gesamtmastzellgehalt und das entsprechende freigesetzte Histamin in % vom Gesamthistamingehalt (Histaminbase) bestimmt.

Degranulierungsvorgänge konnten ab 0,2 µg/ml 48/80 (30 % degranulierte Mastzellen) beobachtet werden und erreichten ihre Maximalwerte bei 1,6 µg/ml 48/80 (76% degranulierte

Mastzellen). Die Histaminfreisetzung bei der niedrigsten Liberatorosis lag bereits bei 77 % und hatte schon ab 0,8 µg/ml 48/80 ihre höchsten Werte zwischen 95 und 98 % erreicht. Unter Kontrollbedingungen ergab sich keine Degranulation und praktisch keine Histaminfreisetzung.

zu_c) Um die Dosen von Compound 48/80 zu ermitteln, die unter Sauerstoff kein Histamin freisetzen bzw. durch die eine maximale Freisetzung erreicht wurde, erstellten wir für 48/80 unter verschiedenen Versuchsbedingungen Dosiswirkungskurven.

Wir untersuchten die 48/80-Wirkung in Konzentrationen zwischen 0,025 und 1,6 µg/ml Reaktionsansatz an Zellen in Peritonealspülflüssigkeit und an gewaschenen Zellen. Die Suspension der gewaschenen Zellen enthielt im Gegensatz zur nativen Peritonealspülflüssigkeit kein Heparin und keine eventuell aus der Peritonealhöhle mitgeführten exogenen Substrate. Die Ergebnisse, die wir mit ihnen erhielten, dienen auch als Bezugsgröße für unsere späteren Versuche (z.B. Substrateffekte auf die 48/80-Wirkung, Versuche in Anoxie), die ebenfalls nicht mit der ursprünglichen Peritonealspülflüssigkeit durchgeführt wurden.

Abb. 8. zeigt Dosiswirkungskurven an gewaschenen und nicht gewaschenen Zellen. Unter beiden Versuchsbedingungen ließ sich mit einer 48/80-Konzentration von 0,4 µg/ml eine fast vollständige Histaminfreisetzung erreichen. Die Versuche mit gewaschenen Zellen wurden zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt. Inwieweit sich in den Dosiswirkungskurven Unterschiede zeigen, die durch den Waschvorgang erklärt werden, muß offen bleiben.

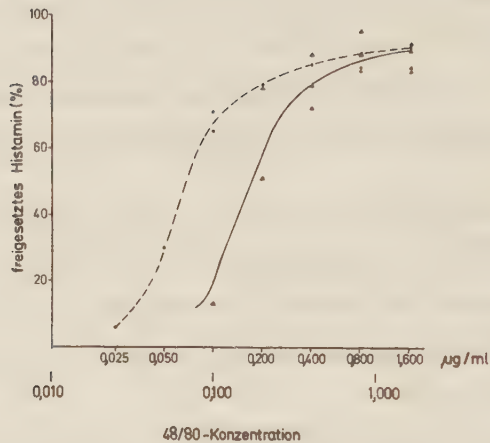


Abb. 8. Dosiswirkungskurven von Substanz 48/80

Die Dosiswirkungskurven von Substanz 48/80 wurden an nativer Peritonealspülflüssigkeit und an gewaschenen Peritonealzellen, resuspendiert in gepufferter Salzlösung + 100 mg% Rinderserumalbumin, erstellt. Die Ansätze wurden nach 15-minütiger Präinkubation 5 Minuten mit 48/80 bzw. 0,9% NaCl-Lösung bei 37°C unter Luftsauerstoff inkubiert. Die 48/80-Konzentration lag zwischen 0,025 und 1,6 µg/ml Reaktionsansatz

Die Spontanfreisetzung lag unter 6 %.

Die Ergebnisse sind im halblogarithmischen Maßstab abgebildet.

● --- ● gewaschene Zellen

▲ ——— ▲ Zellen in Peritonealspülflüssigkeit

zu d) Nach Ermittlung der Dosiswirkungskurven von 48/80 unter Sauerstoff stellte sich nun noch die Frage: Wird die Histaminfreisetzung unter Sauerstoff durch exogenes Substrat-

angebot noch verbessert oder bleibt sie unverändert?

Wir untersuchten die Effekte von Glucose (5 mM), Succinat (1,56 mM) und NADH (0,71 mM) bei den aus der Dosiswirkungskurve verwendeten 48/80-Konzentrationen (0,025 - 1,6 μg 48/80 pro ml Reaktionsansatz).

Unsere Ergebnisse sind in Abb. 9. dargestellt.

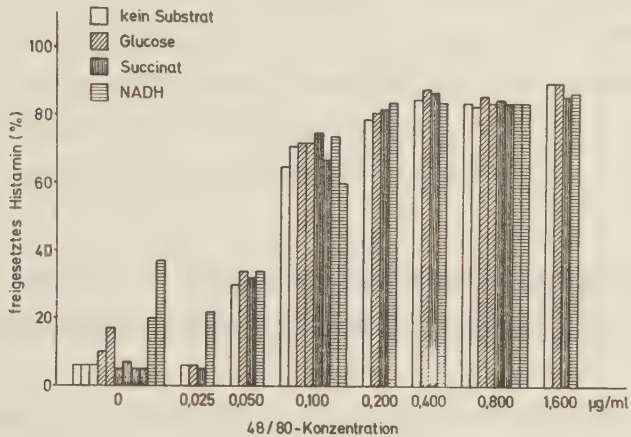


Abb. 9. Histaminfreisetzung in Gegenwart von Sauerstoff und verschiedenen Substraten bei unterschiedlichen Konzentrationen von 48/80

Untersucht werden die Effekte von Glucose (5 mM), Succinat (1,56 mM) und NADH (0,71 mM) auf die Wirkung von 48/80 (0,025 - 1,6 $\mu\text{g/ml}$ Reaktionsansatz). In die Suspension von gewaschenen Peritonealzellen mit oder ohne Substrat wurde nach 15-minütiger Präinkubation bei 37°C unter Luftsauerstoff die Substanz 48/80 bzw. 0,9 % NaCl-Lösung im Kontrollansatz zugegeben. Die Proben wurden 5 Minuten weiterinkubiert und danach die Histaminfreisetzungsreaktion abgestoppt.

Offene Säulen stellen die Wirkung von 48/80 bzw. Kochsalzlösung in Abwesenheit von Substrat auf inkubierte Zellsuspensionen dar.

Die Histaminfreisetzungswerte bei den verschiedenen 48/80-Konzentrationen entsprachen denen aus der Dosiswirkungskurve für gewaschene Peritonealzellen. Weder Glucose, noch Succinat oder NADH vermochten bei Inkubation unter Luft-sauerstoff die Freisetzung im Vergleich zu den Proben ohne exogenes Substrat zu beeinflussen. Nicht erklären können wir die erhöhte Freisetzung im Kontrollansatz und durch $0,025 \mu\text{g}$ 48/80 pro ml in Anwesenheit von NADH.

4. Histaminfreisetzung in Anoxie

a) Mindest-Anoxie-Dauer mit maximaler Hemmung der Histaminfreisetzung

Um eine Vorstellung vom zeitlichen Verlauf der Erschöpfung der Energievorräte in den Mastzellen zu erhalten, versuchten wir zunächst in einer Versuchsserie mit verschiedener Anoxiedauer zwischen 1 Minute und 30 Minuten die Mindestanoxiedauer herauszufinden, ab der die Histaminfreisetzung maximal gehemmt bleibt.

Die folgende Abb. 10. stellt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe als Säulendiagramm dar. Eingezeichnet sind die Einzelwerte der Histaminfreisetzung in % vom Gesamthistamin nach 1, 5, 10, 15 und 30 Minuten Anoxie. 1 Minute unter anoxischen Bedingungen beeinträchtigte die Mastzellen trotz substratfreien Milieus nicht in ihrer Freisetzungsleistung. Sie setzten noch 69,5 % Histamin frei. (Maximale Freisetzung unter Sauerstoff

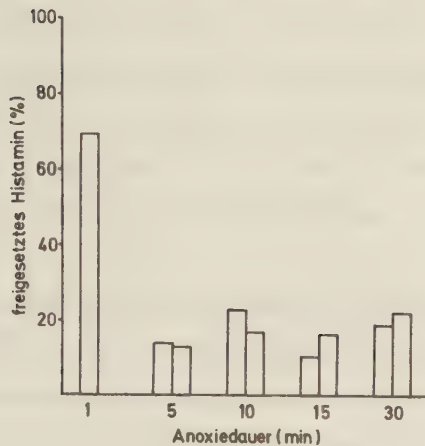


Abb. 10. Histaminfreisetzung aus Peritonealmastzellen nach unterschiedlich langer Anoxie in substratfreiem Medium

Nachdem die Suspensionen aus gewaschenen Peritonealzellen ohne Substratzusatz 1 bis 30 Minuten in Anoxie inkubiert waren, wurde Substanz 48/80 in einer Konzentration von 1,1 $\mu\text{g/ml}$ Reaktionsansatz zugegeben. Mit 48/80 wurde 5 Minuten unter anoxischen Bedingungen weiterinkubiert und danach die Histaminfreisetzungsreaktion abgestoppt. Die Kontrollansätze zur Bestimmung der Spontanfreisetzung wurden nach einer Anoxie von 5 Minuten mit 0,9 % NaCl-Lösung inkubiert und ergaben eine Histaminfreisetzung von 5,6 bzw 10,7 %.

lag an diesem Tag bei 72,3 %). Nach 5 Minuten Anoxie jedoch war die Histaminfreisetzung bereits maximal gehemmt. Der 5-Minutenwert (durchschnittlich 13,4 %) lag nicht wesentlich über dem des Kontrollversuches

(durchschnittlich 8,1 %; NaCl-Lösung statt 48/80).

Auch längere Anoxiezeiten zeigten keine stärkere Hemmung der Histaminfreisetzung. Der Wert für 15 Minuten Anoxie wurde in acht weiteren Versuchen bestätigt:

$9,8 \pm 2,8$ % Freisetzung im Durchschnitt. Der 30 minütige Anoxiewert wurde in vier weiteren Versuchen bestätigt: $12 \pm 6,2$ % Freisetzung im Durchschnitt.

b) Wiederherstellung der Histaminfreisetzung in Anoxie durch verschiedene Substrate oder Sauerstoff

Zur weiteren Untersuchung des Energiestoffwechsels der Mastzellen stellten wir den Proben nach 15 Minuten Anoxiedauer in substratfreiem Milieu verschiedene Substrate bzw. definierte Mengen an Sauerstoff zur Verfügung und bestimmten danach die durch 48/80 (1,1 µg/ml Inkubat) freigesetzte Histaminmenge.

Substrate: Glucose: 5,55 mM NADH: 0,78 mM
Fructose: 5,55 mM ATP: 0,50 µM
Succinat: 1,73 mM

Die Substrate wurden in 10 µl-Volumina zugegeben.

Sauerstoff: Zugabe von 20 - 100 µl sauerstoffgesättigter Pufferlösung.

Ziel dieser Versuchsserie war, eine Auskunft darüber zu erhalten, ob nur, wie bereits bekannt (Diamant (1961) und andere), Glucose- und Sauerstoffgaben die Hemmung der Histaminfreisetzung in Anoxie aufheben oder ob auch andere Substrate als Energielieferanten für den Freisetzungsprozeß dienen können.

Dazu untersuchten wir den Zusammenhang zwischen:

- Anwesenheitsdauer der Substrate und Ausmaß der Wiederherstellung der Histaminfreisetzung in Anoxie (Tab.3.)
- Anwesenheitsdauer von Sauerstoff nach anoxischer Inkubation und Ausmaß der Wiederherstellung der Histaminfreisetzung (Tab.4.)
- Sauerstoffpartialdruck bei 48/80-Gabe und Histaminfreisetzung nach anoxischer Inkubation (Tab.5.)
- Zugabe von Glucose bzw. Sauerstoff allein oder Glucose + Sauerstoff und Ausmaß der Wiederherstellung der Histaminfreisetzung (Abb. 11.)

Tab. 3. zeigt, daß nur Glucose fähig war, die Histaminfreisetzung in Anoxie wiederherzustellen, nicht aber Fructose, Succinat, NADH oder ATP. Die vier letztgenannten Substrate konnten bei einer Anwesenheitsdauer von 1 bzw. 5 Minuten die Histaminfreisetzung nur wenig über die in den Kontrollen ohne Substrat gezeigte Freisetzung verbessern.

Besonders auffällig wurde, daß für die optimale Wirkung von Glucose eine Zeit von mehr als 1 Minute erforderlich war. Wir untersuchten 1 Minute und 5 Minuten Anwesenheit von Glucose vor 48/80-Zugabe. Innerhalb von 1 Minute konnte Glucose die Histaminfreisetzung nur (von 7,3 % ohne Substrat) auf $29,3 \pm 16,0$ % wiederherstellen. 5 Minuten Anwesenheit aber genügten, um $70,3 \pm 5,8$ % Freisetzung zu erreichen im Vergleich zu $11,3 \pm 3,9$ % ohne Substrat. Da die maximale Freisetzung unter Sauerstoff (ohne Substrat) an den entsprechenden Versuchstagen bei 81 % lag, ist also durch Glucose nach 5 Minuten Anwesenheit eine fast voll-

Tab. 2. Histaminfreisetzung unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart verschiedener Substrate

Präsenz der Sub- strate vor	freigesetztes Histamin (%)						Datum
	S u b s t r a t e					Kontrolle	
	Glucose (5,55 mM)	Fructose (5,55 mM)	Succinat (1,73 mM)	NADH (0,78 mM)	ATP (0,50 μ M)		
48/80- Zugabe	46		25			8	27. 8.74
	14			18		6	3.10.74
	28		20	10		8	9.10.74
1 Minute	67		18	14		6	16.10.74
					19	9	18.10.74
	77		13	9		12 10	19.10.74
		16			11	17	26.10.74
	67	25				14	1.11.74
5 Minuten							

In Suspensionen aus gewaschenen Peritonealzellen ohne Substratzusatz wurde nach 15 Minuten Anoxie bei 37 °C Glucose, Fructose, Succinat, NADH oder ATP zugegeben. 1 bzw. 5 Minuten nach Substratzugabe wurde 48/80 (1,1 μ g/ml Reaktionsansatz) hinzugefügt und das gesamte Inkubat 5 Minuten weiterinkubiert. Die Kontrollansätze wurden unter den gleichen Bedingungen ohne Substratzugabe ausgeführt. Die angegebenen Werte stellen die Histaminfreisetzung in % vom Gesamthistamingehalt dar.

ständige Wiederherstellung der Histaminfreisetzung in Anoxie gelungen.

Für Succinat und NADH konnte solch eine Zeitabhängigkeit nicht festgestellt werden.

Für Fructose und ATP wurde sie nicht untersucht.

Tabelle 4. läßt erkennen, daß auch Sauerstoff die Histaminfreisetzung wieder herstellen konnte. Doch auch hier ist wieder die Dauer der Gegenwart von Sauerstoff entscheidend.

War Sauerstoff 30 Sekunden vor 48/80-Gabe nach 15 Minuten Anoxie anwesend, so wurde die Histaminfreisetzung nur von $11,3 \pm 4,9 \%$ (ohne Substrat bei 0 Torr O_2) auf $31,5 \pm 7,9 \%$ verbessert. Bereits nach 60 Sekunden allerdings konnte durch Sauerstoff eine fast maximale Histaminfreisetzung von $61,4 \pm 7,6 \%$ erzielt werden. Der vergleichbare Kontrollwert (ohne Substrat bei 0 Torr O_2) lag hier bei $12 \pm 2 \%$. Die Freisetzung unter Sauerstoff an den entsprechenden Versuchstagen ohne vorausgegangene Anoxie lag bei 84 und 71 %.

In Tab. 4 konnte man bereits ablesen, daß die Wiederherstellung der Histaminfreisetzung nach vorangegangener anoxischer Inkubation durch Sauerstoffgaben bei genügend langer Anwesenheit des Sauerstoffs vor 48/80-Gabe nicht beeinflußt wurde vom aktuellen Sauerstoffpartialdruck bei 48/80-Zugabe.

In Tab. 5. können wir dies noch etwas deutlicher demonstrieren. Nach 15 Minuten Anoxie erreichten wir durch

Tab. 4. Wiederherstellung der Histaminfreisetzung nach anoxischer Inkubation durch kurzzeitige Anwesenheit von Sauerstoff

Datum	Präsenz des Sauerstoffes vor 48/80- Zugabe (Sekunden)	Sauerstoff- partialdruck bei 48/80- Zugabe (Torr)	durch 48/80 freigesetztes Histamin (%) unter Sauer- stoff nach anoxischer Inkubation	in Anoxie (Kontrollen)
9. 9.74		6	24	9
9.10.74	30	7 37	27 42	8
26.10.74		42	33	17
19.10.74	60	4 8 15 20 35	45 62 65 63 72	10
1.11.74		3 12 32	60 64 60	14

zu Tab. 4. Wiederherstellung der Histaminfreisetzung nach
anoxischer Inkubation durch kurzzeitige An-
wesenheit von Sauerstoff

In Suspensionen aus gewaschenen Peritonealzellen ohne Substratzusatz wurden nach 15 Minuten Anoxie (bei 37°C) 20 bis 100 μ l sauerstoffgesättigte Pufferlösung zugegeben. Nach 30 bzw. 60 Sekunden Anwesenheit des Sauerstoffs wurden jeweils 1,1 μ g 48/80 pro ml Reaktionsansatz hinzugefügt und die Reaktionsansätze 5 Minuten weiterinkubiert. Im Kontrollansatz wurde die Histaminfreisetzung nach 15 Minuten Anoxie ohne vorherige Sauerstoffzufuhr bestimmt. Bei Zugrundelegen eines Bunsenschen Absorptionskoeffizienten von 0,024 entspricht bei 37°C 1 Torr 2,54 nMol O₂ pro 1,8 ml Inkubationsvolumen.

Zugabe von definierten Mengen an sauerstoffgesättigter Pufferlösung (20 - 100 μ l, Zugabe 60 Sekunden vor 48/80) Sauerstoffpartialdrucke bei 48/80-Gabe zwischen 3 und 35 Torr. Die hierbei freigesetzten Histaminmengen lagen im Mittel bei $61,4 \pm 7,6$ %. (Kontrollfreisetzung ohne Substrat bei 0 Torr O₂: 12 ± 2 % im Durchschnitt) Abgesehen davon, daß wir den kritischen Sauerstoffpartialdruck mit einer wahrscheinlich geringeren Histaminfreisetzung nicht untersuchten, (der aber nach unseren Ergebnissen zwischen 0 und 3 Torr liegen müßte), können wir die Behauptung aufstellen, daß nach einer Anoxiedauer von 15 Minuten das Ausmaß der Wiederherstellung der Histaminfreisetzung durch Sauerstoff nicht abhängig ist von der Menge Sauerstoff (aktueller pO₂ bei 48/80-

Tab. 5. Histaminfreisetzung bei unterschiedlichem Sauerstoffpartialdruck
nach vorausgegangener anoxischer Inkubation

	Kon- trolle						Datum
pl O ₂ -gesättigte Pufferlösung (Zugabe 60 Sek. vor 48/80)	0	20	40	60	80	100	
O ₂ -Partialdruck bei 48/80-Zugabe (Torr)	0	4	8	15	20	35	19.10.74 1.11.74
durch 48/80 freigesetztes Histamin (μg)	10 14	45 60	62	65	63	72 60	19.10.74 1.11.74

Die Daten entstammen Tabelle 4. Es sind die Versuche mit einer Präsenz von Sauerstoff für 60 Sekunden vor 48/80-Zugabe dargestellt.

Gabe), sondern nur bestimmt wird dadurch, daß überhaupt Sauerstoff anwesend ist, sowie von der Dauer der Anwesenheit von Sauerstoff vor 48/80 Gabe.

Dies, ebenso wie die Zeitabhängigkeit der Glucosewirkung in Anoxie, wird später im Hinblick auf eine Regeneration der Energievorräte in der Mastzelle diskutiert werden müssen.

Nach unseren Ergebnissen über die Wiederherstellung der Histaminfreisetzung nach 15 Minuten Anoxie durch ausreichend lange Anwesenheit von Glucose bzw. Sauerstoff vor 48/80-Zugabe stellten wir noch einen Vergleich über die Effektivität der Wirkung von Glucose gegenüber Sauerstoff bzw. Glucose + Sauerstoff an.

Nach der entsprechenden Anoxiedauer wurden Glucose (5,55 mM) und Sauerstoff entweder in getrennten Ansätzen oder im gleichen Versuch in der als optimal ermittelten Zeit und zwar 5 Minuten (Glucose) bzw. 1 Minute (Sauerstoff) vor Inkubation der Mastzellsuspension mit 48/80 zugegeben. Abb. 11. zeigt unsere Ergebnisse.

Ohne Substratgabe nach Anoxie setzten die Mastzellen kein Histamin nach Einwirkung von 48/80 frei ($10,5 \pm 3,4\%$ Spontanfreisetzung). Eine maximale Wiederherstellung der Histaminfreisetzung nach Hemmung durch Anoxie erzielten die gleichzeitige Anwesenheit von Glucose + Sauerstoff ($75,3 \pm 6,7\%$ Freisetzung). Während Glucose allein $70,3 \pm 5,8\%$ Freisetzung bewirkte, stellte die Anwesenheit von Sauerstoff allein die Histaminliberierung bis auf $59,4 \pm 9,6\%$ wieder her.

Durch die gleichzeitige Anwesenheit von Glucose und Sauerstoff ließ sich mit 75,3 % freigesetztem Histamin keine erhebliche Steigerung der durch Glucose allein bewirkten Freisetzung (70,3 %) erreichen.

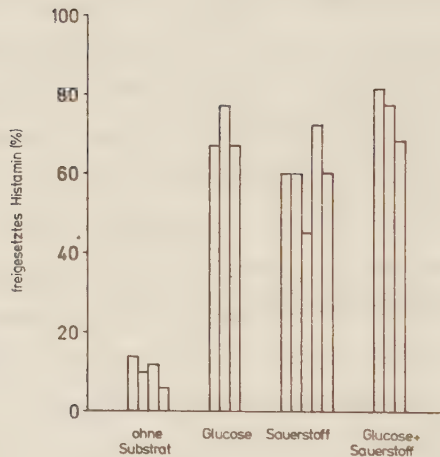


Abb. 11. Wiederherstellung der Histaminfreisetzung nach anoxischer Inkubation durch kurzzeitige Anwesenheit von Glucose oder Sauerstoff bzw. Glucose + Sauerstoff

Suspensionen aus gewaschenen Peritonealzellen ohne Substratzusatz wurden 15 Minuten unter anoxischen Bedingungen bei 37°C präinkubiert. Danach

wurde Glucose (5,55 mM), sauerstoffgesättigte Pufferlösung bzw. Glucose plus sauerstoffgesättigte Pufferlösung hinzugefügt und das gesamte Inkubat nach Zugabe von 48/80 (1,1 μ g/ml Reaktionsansatz) 5 Minuten weiterinkubiert. Die Kontrollansätze wurden ohne Substratzugabe ausgeführt. Als Dauer der Anwesenheit von Glucose bzw. Sauerstoff vor 48/80-Gabe wählten wir die in Tab. 4. bzw. Tab. 5. beschriebenen optimalen Zeiten von 5 Minuten (Glucose) bzw. 1 Minute (Sauerstoff).

D i s k u s s i o n

Charakteristika von Peritonealmastzellen der Ratte: Mastzellmenge, Mastzelldurchmesser, Histamingehalt

Unsere Ergebnisse, die wir an männlichen Sprague-Dawley Ratten zwischen 110 und 620 g erhielten, zeigen, daß eine Korrelation besteht zwischen Rattengewicht und Mastzellmenge in der Peritonealspülflüssigkeit, Größe des Mastzelldurchmessers und Histamingehalt der Mastzellen, und zwar nehmen alle genannten Parameter mit steigendem Rattengewicht zu.

PADAWER und GORDON (1956) berichteten ähnliche Ergebnisse von männlichen Ratten eines Long-Evans-Stammes zwischen 100 und 600 g hinsichtlich Mastzellgehalt der Peritonealflüssigkeit und Mastzelldurchmesser, CHAKRAVARTY und ZEUTHEN (1965) von männlichen Sprague-Dawley Ratten zwischen 400 und 560 g für den Mastzelldurchmesser und JAQUES und RÜEGG (1970) für den Mastzellgehalt sowie Gesamthistamingehalt in der Peritonealflüssigkeit.

Die Angaben über den mittleren Mastzelldurchmesser von verschiedenen Autoren haben wir zum Vergleich mit unserem Ergebnis in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Autor	Rattenstamm und Rattengewicht	mittlerer Mastzelldurchmesser μm
CHAKRAVARTY und ZEUTHEN (1965)	Sprague - Dawley 400 - 560 g	12,75 $\pm$ 0,09 (*)
SUGIYAMA (1970)	Wistar	12,20 $\pm$ 0,25 (*)
TIZARD und HOLMES (1974)	Wistar "ausgewachsen"	13 bis 15
unser Ergebnis (n = 28)	Sprague - Dawley 110 - 620 g	13,00 $\pm$ 0,19 (*)

(*) Standardfehler des Mittelwertes

Der auf die Mastzellzahl bezogene Histamingehalt in der Peritonealflüssigkeit beträgt bei uns im Durchschnitt $1,81 \pm 0,45 \mu\text{g}$ Histaminbase pro 10^5 Mastzellen. Dieser Wert stimmt mit den in der Literatur referierten Ergebnissen für isolierte Mastzellen überein:

Autor	Histamingehalt $\mu\text{g} / 10^5 \text{ Z}$	Histaminbestimmungs- methode
UVNÄS und THON (1961)	ca. 1,3	biologisch
MORAN et al. (1962)	3,15 $\pm$ 0,2 (*)	biologisch
KAHL (1966)	1,60 $\pm$ 0,2	biologisch
FILLION et al. (1970)	3,41 $\pm$ 0,6 (**)	fluorometrisch
SLORACH (1970)	2,98	fluorometrisch
JOHANSEN und CHAKRAVARTY (1972)	ca. 3 (aus Tabelle errechnet)	fluorometrisch
JOHNSON und MORAN (1974)	1,07 $\pm$ 0,25 (*)	biologisch

(*) Standardfehler des Mittelwertes

(**) einfache Standardabweichung

Da die Mastzellen nur ca. 2 bis 10 % des Gesamtzellgehaltes der Peritonealflüssigkeit ausmachen (LAGUNOFF und BENDITT, 1960 ; KAHL, 1966 und andere), ist von Bedeutung, daß gezeigt wurde, daß der Histamingehalt in der Peritonealflüssigkeit nur von den Mastzellen und nicht auch noch von anderen Zelltypen stammt.

LAGUNOFF und BENDITT (1960) führten diesen Beweis, indem sie durch Zentrifugation von Peritonealzellen mittels konzentrierter Saccharose- oder Albuminlösung Zellpopulationen mit einem unterschiedlichen Anteil an Mastzellen gewannen. Da der unterschiedliche Histamingehalt in diesen Zellpopulationen bei Bezug auf die jeweilige Mastzellzahl einen konstanten Wert ergab, kann gefolgert werden, daß alles Histamin in der Peritonealflüssigkeit aus den Mastzellen stammt.

Zeitwirkungskurve von Substanz 48/80

MORAN et al. (1962) und JOHNSON und MORAN (1969, 1974) untersuchten den Zeitbedarf der 48/80-Wirkung bei Zimmertemperatur (22 - 24 °C) an glucosehaltigen Mastzell-suspensionen.

Sie kleideten einen Trichter mit Filterpapier aus, gaben die Zellen darauf und durchspülten das System mit Pufferlösung. Danach perfundierten sie die Mastzellen mit 48/80-haltiger Pufferlösung, fingen das zellfreie Filtrat fraktioniert in 15-Sekundenabständen auf und bestimmten in diesen einzelnen Portionen das freigesetzte Histamin. Durch Vergleich mit einer Auswaschkurve, die

mit einer Substanz bekannter Konzentration in einem zellfreien Filter durchgeführt wurde (Evans blue: JOHNSON und MORAN, 1974 ; 5-Hydroxy-Tryptamin: MORAN et al., 1962), kamen beide Autoren zu dem Ergebnis, daß die Histaminfreisetzung in weniger als 15 Sekunden stattgefunden haben muß.

Die Nachteile dieser Methode scheinen zu sein, daß die exakte Kontaktzeit des Liberators mit den Mastzellen nicht bestimmt werden kann, daß die Filtrate nur in 15-Sekundenabständen und nicht noch kürzer aufgefangen und bestimmt werden und daß ein recht großer methodischer Aufwand notwendig ist.

Unsere Methode ist die von BLOOM et al. (1967) beschriebene, die auch von NOSAL et al. (1970) angewendet wurde.

Beide Autoren machten ihre Untersuchungen an substratfreien Mastzellsuspensionen bei 37 °C. Jeweils 1 bis 2 ml Zellsuspension wurden in Zentrifugenröhrchen inkubiert. Nach kurzer Präinkubation bei 37 °C wurde der Histaminliberator zugegeben und die Freisetzungsreaktion nach der gewünschten Minwirkzeit von 48/80 (BLOOM et al.: 5 bis 60 Sekunden; NOSAL et al.: 5 bis 120 Sekunden; wir: 7 Sekunden bis 20 Minuten) durch Abkühlen der Probe und Verdünnung des Liberators zu unwirksamen Konzentrationen mittels Zugabe von 8 bis 10 ml eiskalter Pufferlösung abgestoppt. Nach Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge bei 0 bis 4 °C wurde an Sediment und Überstand die Histaminbestimmung vorgenommen.

Nach 5 Sekunden waren fast 75 % des freisetzbaren Histamins

im Überstand, nach 10 Sekunden war die Histaminfreisetzung maximal und konnte durch längere Inkubationszeiten nicht mehr verbessert werden.

Unser Ergebnis (nach 7 Sekunden maximale Freisetzung) stimmt mit diesen Werten überein.

Wir konnten außerdem beobachten, daß die Anwesenheit von Glucose weder die Geschwindigkeit noch das Ausmaß der Histaminfreisetzung beeinflußt und sehen eine Bestätigung dieses Befundes in der Übereinstimmung der Ergebnisse von MORAN et al. (1962) und JOHNSON und MORAN (1969, 1974), deren Mastzellproben Glucose enthielten, und von BLOOM et al. (1967) und NOSAL et al. (1970), die glucosefreie Proben verwendeten.

Der Vorteil dieses Versuchsschemas scheint uns darin zu liegen, daß mit geringem methodischen Aufwand eine genaue Zeitabhängigkeit der 48/80-Wirkung für sehr kurze Einwirkzeiten bis ca.5 Sekunden ermittelt werden kann.

Beeinflußbarkeit der Histaminfreisetzung durch verschiedene Substrate unter Sauerstoff

Die von verschiedenen Autoren referierten Ergebnisse hinsichtlich Stimulierbarkeit der 48/80-induzierten Histaminfreisetzung durch Substrat weisen manche Diskrepanzen auf.

So fanden DIAMANT (1962c) und DIAMANT und FREDHOLM (1963) in ihren Untersuchungen an Rattenlungengewebe eine erhöhte Histaminfreisetzung nur in Gegenwart von Glucose (5,6 mM), nicht aber bei Zufuhr von Succinat (5,6 mM).

Bei Meerschweinchenlunge beobachteten sie eine Stimulierung der Histaminfreisetzung sowohl durch Glucose wie auch durch Succinat.

DIAMANT und PETERSON (1970) hingegen untersuchten die Histaminfreisetzung an isolierten Mastzellen und konnten keine Veränderung der Freisetzungsrates in Gegenwart von Glucose (0,6 mM) feststellen.

CHAKRAVARTY (1962) und CHAKRAVARTY und SÖRENSEN (1973) untersuchten die anaphylaktische Histaminfreisetzung aus Meerschweinchenlungengewebe. Sie konnten eine Stimulierung in Gegenwart von Succinat beobachten, nicht aber durch Glucosezufuhr (CHAKRAVARTY, 1962).

Eine Klärung dieser Unterschiede ist mit den methodischen Angaben der oben genannten Autoren nicht möglich.

Daß der negative Befund von DIAMANT und PETERSON (1970) durch die niedrige Glucosekonzentration erklärt werden kann ist nicht wahrscheinlich, denn 0,6 mM Glucose sind ausreichend, die ATP-induzierte Histaminfreisetzung auf das Doppelte zu steigern (DIAMANT und PETERSON, 1970; 1971) und eine Histaminfreisetzung durch 48/80 nach Blockierung mit Antimycin A wiederherzustellen (PETERSON und DIAMANT, 1972; PETERSON, 1974b).

Die unterschiedlichen Succinateeffekte können eventuell als speziebedingte erklärt werden, was aber nicht bewiesen ist.

Unsere Untersuchungen mit 48/80 an gemischten Peritonealzellpopulationen stimmen von der Methodik her mit den Versuchen von DIAMANT (1962c) und DIAMANT und FREDHOLM (1963)

überein, da auch sie in ihren Gewebepräparaten keine einheitliche Zellform vorfanden. Doch unsere Ergebnisse stehen nicht in Einklang mit ihren Befunden. Weder Glucose (5 mM) noch Succinat (1,56 mM) noch NADH (0,71 mM), eine bisher noch nicht untersuchte Substanz, vermögen die Histaminfreisetzung zu beeinflussen.

Ein möglicher Einwand gegen unsere negativen Befunde wäre, daß die zugeführten Substrate von den in großer Überzahl vorhandenen restlichen Zellen in der Peritonealflüssigkeit aufgenommen und so den Mastzellen als Substrat entzogen werden.

Bei unseren später noch zu diskutierenden Anoxiever-suchen mit gemischten Peritonealzellen dürften sich die anderen Zellen genauso im Energiemangel befunden haben wie die Mastzellen. Da dort die gleiche Dosis an Glucose wieder eine Histaminfreisetzung ermöglichte, hat die angebotene Glucosemenge trotz der wahrscheinlich nicht geringeren Konkurrenz der anderen Zellen um dieses Substrat ausgereicht. Wahrscheinlich würde unter Sauerstoff genügend Glucose für eine Verbesserung der Histaminfrei-setzung zur Verfügung stehen.

Hemmung der Histaminfreisetzung durch Anoxie:

Abhängigkeit von der Dauer der substrat- und sauerstoff-
freien Präinkubation

1 Minute unter anoxischen Bedingungen in substratfreiem Milieu beeinträchtigte die Mastzellen noch nicht in ihrer Freisetzungsleistung.

Wir erhielten 5 Minuten als Mindestanoxiedauer, ab der die Freisetzung vollständig gehemmt ist.

Die wenigen zu diesem Thema in der Literatur referierten Befunde weisen manche Unterschiede auf.

So berichteten DIAMANT (1961) eine Hemmung der anaphylaktischen Histaminfreisetzung aus Rattenlungengewebe nach 15 Minuten Begasen mit Stickstoff und DIAMANT und UVNÄS (1961) ebenfalls nach 15 Minuten Stickstoffbegasung in einer Warburg-Apparatur eine Aufhebung der Freisetzung durch 48/80 aus der Rattenlunge.

PERERA und MONGAR (1965) hingegen beobachteten, daß die Histaminfreisetzung aus isolierten Mastzellen, in verschlossenen Zentrifugenröhrchen inkubiert, nach 15 Minuten Begasung mit Stickstoff noch unverändert stattfindet, nach 30 Minuten Stickstoffbegasung erst um 24 % und nach 60 Minuten um 64 % vermindert ist.

Da bei dieser Methode des Begasens mit Stickstoff nicht gemessen werden kann, wieviel Restsauerstoff in der Lösung bleibt, ob überhaupt Anoxie eingetreten ist und wo der genaue Zeitpunkt des Anoxiebeginns liegt, erscheinen uns obige Ergebnisse als nicht eindeutig.

Diese Ungenauigkeitsfaktoren konnten wir mit der von uns verwendeten Inkubations- und Meßanordnung ausschließen. Obwohl wir keine kürzere Anoxiezeit als 5 Minuten untersuchten, schließen wir doch aus einigen Befunden der Literatur, wo eine Hemmung der Histaminfreisetzung nach 2 bis 3 Minuten Präinkubation mit Antimycin A in substratfreiem Milieu (PETERSON und DIAMANT, 1972; PETERSON, 1974a; 1974b) eintrat, daß auch durch eine noch kürzere Anoxiedauer als 5 Minuten die Energiereserven in den Mastzellen so weit verringert werden können, daß die Histaminfreisetzung nicht stattfindet.

Wiederherstellung der Histaminfreisetzung in Anoxie durch Substrat- bzw. Sauerstoffzufuhr

Um eine Wiederherstellung der in Anoxie gehemmten Histaminfreisetzung zu erreichen, untersuchten wir folgende Substrate:

Glucose (5,55 mM) und Fructose (5,55 mM) als Kohlenhydratsubstrate mit einem eventuell möglichen anaeroben Abbau,

Succinat (1,73 mM) als Substrat des Zitratzyklus,

NADH (0,78 mM) als indirekter Energielieferant durch seinen Eintritt in die Atmungskette,

ATP ($5 \cdot 10^{-7}$ M) als direkter Energielieferant der Zelle, Sauerstoff als Substrat, das den oxydativen Abbau von endogenen Substraten ermöglicht.

Die Zufuhr von Succinat blieb erwartungsgemäß ohne Erfolg, und wir können damit die Befunde von CHAKRAVARTY (1962),

DIAMANT (1962c) und CHAKRAVARTY und SÖRENSEN (1973) bestätigen.

Wahrscheinlich kann die ausbleibende Wirkung von Succinat damit erklärt werden, daß es unter anaeroben Bedingungen nicht metabolisiert werden kann. Unter Sauerstoffmangel kommt es zu einem Rückstau von Elektronen in der Atmungskette, wodurch dann der bei der Dehydrogenierung von Succinat entstehende Wasserstoff nicht zu Wasser oxydiert werden kann.

Daß NADH nicht als Energielieferant für den Histaminfreisetzungsprozeß dienen konnte, läßt sich möglicherweise durch einen ähnlichen Mechanismus erklären, doch besteht außerdem noch die Möglichkeit, daß NADH erst gar nicht die Mastzellmembran passieren konnte (FRIEDRICH, 1976).

ATP gaben wir in einer Konzentration zu, die, nach einer von SUGIYAMA (1971) aufgestellten Dosis-Wirkungskurve, und auch wie von uns in einigen Versuchen kontrolliert, unterhalb der selbst histaminfreisetzenden Dosis liegt. Nach den Angaben von JOHANSEN und CHAKRAVARTY (1972), DIAMANT (1967) und JOHNSON und MORAN (1969) über den intrazellulären ATP-Gehalt in Mastzellen liegen wir mit unserer ATP-Konzentration noch um den Faktor 1000 über diesem endogenen Gehalt, was ausreichend sein müßte, um als Energiedonator dienen zu können.

Unser negativer Befund kann also nicht durch eine zu niedrige ATP-Zufuhr erklärt werden, sondern vielleicht dadurch, daß dieses Nukleotid die Barriere der Mastzellmembran nicht passieren kann.

Fructose konnte die durch Anoxie gehemmte Histaminfreisetzung nicht wiederherstellen.

Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund von DIAMANT und UVNÄS (1961), die Untersuchungen mit 48/80 an Rattenlungengewebe vornahmen, überein.

Aber CHAKRAVARTY (1968) konnte zeigen, daß isolierte Mastzellen Fructose unter Sauerstoffangebot metabolisieren und in CO_2 überführen können. Es ist also anzunehmen, daß die entsprechende Kinase in den Mastzellen vorhanden ist, so daß Fructose phosphoryliert und in die Zelle transportiert werden kann. Möglicherweise läuft aber dann der weitere Abbau von Fructose nicht über den Embden-Meyerhof-Weg, sondern über einen aeroben Stoffwechselweg, der in Anoxie nicht stattfinden kann, was den negativen Befund für Fructose erklären könnte.

Nur Glucose- oder Sauerstoffzufuhr konnte den Hemmeffekt der Anoxie auf die Histaminfreisetzung antagonisieren. Dieser Befund wurde vielfach in der Literatur referiert, doch dabei sind manche Diskrepanzen festzustellen: DIAMANT (1961) beobachtete, daß die Histaminfreisetzung durch Ascaris suis-Extrakt aus Rattenlungengewebe in Anoxie gehemmt ist und durch Zugabe von Sauerstoff wieder 60 %, durch Glucose 80 % der Normalwerte erreicht werden.

DIAMANT (1962a) konnte eine völlige Aufhebung der Hemmung nur durch Zugabe von Glucose und Sauerstoff beobachten, während die Zugabe von Glucose oder Sauerstoff allein nicht ausreichte.

Im Gegensatz dazu steht der Befund von PERERA und MONGAR (1965). Sie berichteten, daß die 70 %ige Hemmung der Histaminfreisetzung aus isolierten Mastzellen, die sie nach 60 Minuten Präinkubation in glucosefreiem Medium unter Stickstoff registrierten, durch wahlweise Glucose- oder Sauerstoffzufuhr allein aufgehoben werden konnte. Es war ausreichend, wenn eines der beiden Substrate ca. 5 Minuten vor Antigen- oder 48/80-Gabe in das Inkubationsmedium gegeben wurde.

Der Glucoseeffekt wurde noch von vielen anderen Autoren beschrieben, zum Beispiel:

DIAMANT und UVNÄS (1961), DIAMANT (1962c).

Insgesamt gesehen sprechen alle Befunde über die Glucosewirkung dafür, daß die Mastzellen Glucose über einen anaeroben Stoffwechselweg abbauen und dadurch genügend Energie gewinnen, um den Freisetzungsprozeß vollbringen zu können. Zu der Vermutung, daß die Energiegewinnung über Substratphosphorylierung in der Glycolyse stattfindet, veranlassen uns die Berichte von PETERSON und DIAMANT (1971, 1972, 1974a) und PETERSON (1974b), die in Anwesenheit von Antimycin A als Hemmstoff der Atmungskette durch Glucosezufuhr eine gesteigerte Lactatbildung aus isolierten Mastzellen beobachten konnten und von DIAMANT und PETERSON (1970, 1971) und DIAMANT et al. (1974), die die Glucoseeffekte durch den Glycolysehemmstoff Jodacetat aufheben konnten.

Bemerkenswert erscheint uns der Befund, daß Glucose und Sauerstoff eine in unseren Experimenten ermittelte Mindestzeitspanne vor der Zugabe von 48/80 vorhanden sein müssen, ehe sie die Histaminfreisetzung in Anoxie wiederherstellen können, und daß das Ausmaß der Wiederherstellung der Freisetzung durch Sauerstoff nicht abhängig ist von dem aktuellen Sauerstoffpartialdruck bei 48/80-Gabe.

Wir untersuchten die Histaminfreisetzung nach Anoxie bei Sauerstoffpartialdrucken zwischen 3 und 35 Torr und konnten dabei eine Wiederherstellung der Freisetzung beobachten. Ob bei Partialdrucken unter 3 Torr Sauerstoff ein kritischer Punkt erreicht wird, ab dem nur eine verminderte Histaminfreisetzung möglich ist, haben wir nicht untersucht. Möglicherweise sind aber nur Spuren von Sauerstoff notwendig, um oxydative enzymatische Prozesse zu ermöglichen.

Als Mindestzeitbedarf für die volle antagonisierende Wirkung von Glucose in Anoxie ermittelten wir 5 Minuten, für die von Sauerstoff 1 Minute.

Als Vergleichswert für Sauerstoff konnten wir in der Literatur nur eine Aussage finden, und zwar berichteten PIERERA und MONGAR (1965), daß es ausreichend ist, 100 % Sauerstoff 5 Minuten vor Zugabe des Histaminliberators in das Inkubationsmedium einzuleiten, um die Freisetzung nach Anoxie wiederherzustellen.

Für Glucose trafen wir unterschiedliche Ergebnisse an: DIAMANT und UVNÄS (1961) untersuchten die Histaminfreisetzung mit 48/80 aus Rattenlungengewebe und berichteten,

daß Glucose nach 15 Minuten Anwesenheit die Histaminfreisetzung in Anoxie wieder ermöglicht. Kürzere Zeiten wurden von ihnen nicht untersucht.

PERERA und MONGAR (1965) beobachteten eine Wiederherstellung der Freisetzung aus isolierten Mastzellen in Anoxie, nachdem Glucose 5 Minuten vor Liberatorzugabe anwesend ist.

Erst PETERSON (1974b) erarbeitete eine Zeitabhängigkeit der Glucosewirkung im Hinblick auf eine Wiederherstellung des intrazellulären ATP-Gehaltes und damit einhergehende Histaminfreisetzung nach 3 Minuten Präinkubation von isolierten Mastzellen in substratfreiem Milieu mit Antimycin A. Durch Antimycin A wird der ATP-Spiegel auf ca. 25 % des Normalwertes reduziert. Eine Histaminfreisetzung war jetzt nicht zu erzielen. 1 Minute nach Glucosezufuhr konnte er eine teilweise Wiederherstellung des ATP-Gehaltes und auch der Histaminfreisetzung beobachten. Nach 2,5 Minuten erreichte der ATP-Spiegel ca. 75 % des Normalwertes und die Histaminfreisetzung war wieder völlig hergestellt.

Da wir wohl annehmen dürfen, daß ebenso wie nach Inhibitoren des oxydativen Stoffwechsels wie zum Beispiel Antimycin A, Oligomycin oder Dinitrophenol auch in Anoxie sehr rasch eine Verminderung der intrazellulären ATP-Reserven durch Ausschaltung ihrer Regeneration über die oxydative Phosphorylierung eintritt, läßt sich vielleicht die Zeitabhängigkeit des Glucose- oder Sauerstoffeffektes im Hinblick auf einen Wiederaufbau des intrazellulären

Energiereservoirs interpretieren.

Daß Sauerstoff allein ohne exogene Glucosezufuhr die Freisetzung wieder ermöglichen konnte, läßt uns außerdem vermuten, daß es in Anoxie zu keinem vollständigen Verlust von endogenen Substraten kam, insbesondere von solchen, die einem oxydativen Abbauweg unterliegen, wie zum Beispiel Pyruvat und Lactat.

Zur Fragestellung, ob die Histaminfreisetzung mit einem Energiemehrverbrauch einhergeht und ob sich dieser in einem Sauerstoffmehrverbrauch äußert, führten wir einen orientierenden Versuch an einer >95% reinen substratfreien Mastzellsuspension durch.

Wir wählten die Versuchsanordnung wie in Methoden 4 d) beschrieben.

Die Basisatmung der Mastzellen betrug

$0,039 \text{ nMol O}_2 / \text{Min} \times 10^5$ Mastzellen und stimmt also mit den in der Literatur referierten Werten für isolierte Mastzellen überein (CHAKRAVARTY und ZEUTHEN, 1965: 0,035; KAHL, 1966: 0,066).

Nachdem die Zellen 15 Minuten in Anoxie waren, wurden 100 μl sauerstoffgesättigter Pufferlösung und 30 Sekunden später 5 μl 48/80 in maximal freisetzender Dosis zugegeben. Durch Zugabe dieser Puffermenge stieg der Sauerstoffpartialdruck im Meßgefäß auf 40 Torr an, was etwa demjenigen bei Versuchsbeginn entsprach.

Der Sauerstoffverbrauch der Mastzellen stieg unter diesen Bedingungen auf $0,060 \text{ nMol O}_2 / \text{Min} \times 10^5$ Mastzellen an. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors von 5,6% entspräche dies einem Sauerstoffmehrverbrauch gegenüber der Basisatmung von 59 %.

Die zeitliche Koinzidenz dieses Sauerstoffmehrverbrauches mit der Histaminfreisetzung beurteilten wir durch mikroskopische Kontrolle einer Zellprobe, die 5 Minuten nach 48/80-Zugabe entnommen wurde.

Die Mastzellen waren zu etwa 40 % degranuliert, was unseren Ergebnissen über eine Sauerstoffanwesenheit von 30 Sekunden

vor Liberatorzugabe entspricht (vgl. Tab. 7).

Trotzdem kann die Frage, ob die Histaminfreisetzung mit einem Energiemehrverbrauch einhergeht, der sich in einem Sauerstoffmehrverbrauch äußert, nicht eindeutig beantwortet werden, da durch eine Anzahl von Experimenten geklärt werden müßte, ob sich in der Zunahme der Atmung ein Nachholbedarf der Zellen durch die vorausgegangene Anoxie ausdrückt.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Neuere Theorien über den Mechanismus der Histaminfreisetzung und das Problem der Energieabhängigkeit dieses Vorganges werden anhand der Literatur dargestellt.
2. Für den Histaminliberator 48/80 werden unter den von uns später angewandten Versuchsbedingungen eine Zeitwirkungskurve und eine Dosiswirkungskurve erstellt: Die Histaminfreisetzung durch 48/80 beginnt in den ersten Sekunden nach Zugabe des Liberators und erreicht bereits nach 7 Sekunden fast maximale Werte. Mit einer 48/80-Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ erreichten wir eine Histaminfreisetzung von 30%, mit 0,4 $\mu\text{g/ml}$ fast vollständige Freisetzung von 85%.

Außerdem werden verschiedene Substrateffekte auf die 48/80-Wirkung unter Sauerstoff untersucht.
3. Es wird eine Versuchsanordnung beschrieben, die es gestattet, mit Hilfe einer polarographischen Meßtechnik den Sauerstoffpartialdruck in einem geschlossenen Inkubationsgefäß kontinuierlich aufzuzeichnen. So war der Sauerstoffpartialdruck zu jedem Zeitpunkt der Inkubation bekannt, und die Einhaltung anoxischer Inkubationsbedingungen konnte gut überwacht werden.
4. Nach sauerstoff- und substratfreier Präinkubation der Mastzellen war eine Histaminfreisetzung durch 48/80 nicht mehr möglich. Als Mindestzeitbedarf dieser Präinkubation, ab der die Histaminfreisetzung maximal gehemmt bleibt, ermittelten wir 5 Minuten.

5. Die in der Literatur beschriebene Aufhebung der durch Anoxie gehemmten Histaminfreisetzung durch Glucose- oder Sauerstoffzufuhr konnten wir bestätigen. Die anderen Substanzen Fructose, Succinat, NADH und ATP, die wir unter der gleichen Fragestellung untersuchten, blieben jedoch ohne Erfolg.
6. Für Glucose und Sauerstoff erarbeiteten wir eine Zeitabhängigkeit ihrer Wirkung in Anoxie. Sauerstoff mußte 1 Minute, Glucose 5 Minuten vor Liberatorzufuhr in das Inkubationsmedium gegeben werden, um die Histaminfreisetzung in Anoxie völlig wiederherzustellen.
7. Die Restitution der Histaminfreisetzung durch Sauerstoff zeigte keine Abhängigkeit von der zugeführten Sauerstoffmenge. Noch durch 3 Torr $O_2 \hat{=} 4,23 \text{ nMol } O_2/\text{ml}$ konnte die Histaminfreisetzung völlig wiederhergestellt werden.
8. Die Restitution der Histaminfreisetzung durch Sauerstoff war nicht ganz so effektiv wie die durch Glucose. Optimale Wirkung konnten wir durch Zugabe von Glucose + Sauerstoff erzielen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

AMSTERDAM, A., I. OHAD and M. SCHRAMM: Dynamic changes in the ultrastructure of the acinar cell of the rat parotid gland during the secretory cycle.

J. Cell Biol. 41, 753-773 (1969)

ANDERSON, P., P. RÖHLICH, S. A. SLORACH and B. UVNÄS:

Morphology and storage properties of rat mast cell granules isolated by different methods.

Acta physiol. scand. 91(2), 145-153 (1974)

ASSEM, E. S. K. and A. W. RICHTER: Comparison of in vivo and in vitro inhibition of the anaphylactic mechanism by β -adrenergic stimulants and disodium cromoglycate.

Immunology, 21, 729-739 (1971)

BLOOM, G. D., B. FREDHOLM and Ö. HÄGERMARK: Studies on the time course of histamine release and morphological changes induced by histamine liberators in rat peritoneal mast cells.

Acta physiol. scand. 71, 270-282 (1967)

BLOOM, G. D. and Ö. HÄGERMARK: A study on morphological changes and histamine release induced by compound 48/80 in rat peritoneal mast cells.

Exp. Cell Res. 40, 637-654 (1965)

BLOOM, G. D. and Ö. HÄGERMARK: Studies on morphological changes and histamine release induced by bee-venom, n-decylamine and hypotonic solutions in rat peritoneal mast cells.

Acta physiol. scand. 71, 257-269 (1967)

BOURNE, H.R., L.M.LICHTENSTEIN and K.L.MELMON:

Pharmacological control of allergic histamine
release in vitro: evidence for an inhibitory role
of 3',5'-adenosinemonophosphate in human leukocytes.
J. Immunology 108(3), 695-705 (1972)

BOURNE, H.R., K.L.MELMON and L.M.LICHTENSTEIN: Histamine
augments leukocyte adenosine-3',5'-monophosphate
and blocks antigenic histamine release.
Science 173, 743-745 (1971)

BUTCHER, R.W. and E.W.SUTHERLAND: Adenosine-3',5'-phosphate
in biological materials. I. Purification and properties
of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use
of this enzyme to characterize adenosine-3',5'-phosphate
in human urine.
J. biol.Chem. 237, 1244-1250 (1962); zit. nach:
SUTHERLAND, E.W. and G.A.ROBINSON, Pharmacol. Rev. 18,
145-161 (1966)

CHAKRAVARTY, N.: Aerobic metabolism in anaphylactic
reaction in vitro.

Am. J. Physiol. 203(6), 1193-1198 (1962)

CHAKRAVARTY, N.: Glycolysis in rat peritoneal mast cells.
J. Cell Biol. 25, 123-128 (1965)

CHAKRAVARTY, N.: Uptake and oxidative utilization of
glucose, fructose and galactose by rat mast cells.
Biochem. Pharmacol. 17, 643-645 (1968)

CHAKRAVARTY, N. and H.J.SÖRENSEN: Potentiation of anaphy-
lactic histamine release from guinea-pig lung by
maleate and succinate.
Acta physiol. scand. 88, 401-411 (1973)

CHAKRAVARTY, N. and E. ZEUTHEN: Respiration of rat peritoneal mast cells.

J. Cell Biol. 25, 113-121 (1965)

COOPER, P. H. and D. R. STANWORTH: A simple and reproducible method of isolating rat peritoneal mast cells in high yield and purity.

Prep. Biochem. 4(2), 105-114 (1974)

DIAMANT, B.: Histamine release elicited by extracts from *Ascaris suis*- Influence of oxygen lack and glucose. Acta physiol. scand. 52, 8-27 (1961)

DIAMANT, B.: Observations on anaphylactic and compound 48/80 induced histamine release from guinea-pig and rat lung tissue in vitro.

Acta physiol. scand. 55, 11-25 (1962a)

DIAMANT, B.: Further observations on the effect of anoxia on histamine release from guinea-pig and rat lung tissue in vitro.

Acta physiol. scand. 56, 1-16 (1962b)

DIAMANT, B.: Comparison between the effects of glucose and sodium succinate on the in vitro release of histamine from guinea-pig and rat lung tissue.

Acta physiol. scand. 56, 103-111 (1962c)

DIAMANT, B.: The effects of compound 48/80 and distilled water on the adenosine triphosphate content of isolated rat mast cells.

Acta physiol. scand. 71, 283-290 (1967)

DIAMANT, B. and B. FREDHOLM: Effect of glucose and sodium succinate on oxygen uptake and histamine release in rat and guinea-pig lung tissues in vitro.

Acta physiol. scand. 59, 193-198 (1963)

DIAMANT, B., N. GROSMAN, P. STAHL SKOV and S. THOMLE:

Effect of divalent cations and metabolic energy on the anaphylactic histamine release from rat peritoneal mast cells.

Int. Arch. Allergy appl. Immunology 47(3), 412-424 (1974)

DIAMANT, B. and P. G. KRÜGER: Histamine release from isolated rat peritoneal mast cells induced by adenosine-5'-triphosphate.

Acta physiol. scand. 71, 291-302 (1967)

DIAMANT, B., P. G. KRÜGER and B. UVNÄS: Local degranulation of individual rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80.

Acta physiol. scand. 79, 1-5 (1970)

DIAMANT, B., S. WORN, P. FELDING, N. OLSEN, A. ZIEBELL and J. NISSEN: ATP-level and CO₂-production of mast cells in anaphylaxis.

Acta physiol. scand. Suppl. 396, 120 (1973)

DIAMANT, B. and C. PETERSON: The effect of glucose on histamine release from isolated rat peritoneal mast cells induced by adenosine-5'-triphosphate.

Acta physiol. scand. 80(3), 299-306 (1970)

DIAMANT, B. and C. PETERSON: The metabolism of mono-saccharides in isolated rat mast cells and its influence on histamine release induced by adenosine-5'-triphosphate.

Acta physiol. scand. 83(3), 324-334 (1971)

DIAMANT, B. and B. UVNÄS: Evidence for energy-requiring processes in histamine release and mast cell degranulation in rat tissues induced by compound 48/80.

Acta physiol. scand. 53, 315-329 (1961)

- FILLION, G.M.B., S.A. SLORACH and B. UVNAS: The release of histamine, heparin and granule protein from rat mast cells treated with compound 48/80 in vitro. *Acta physiol. scand.* 78, 547-560 (1970)
- FRIEDRICH, K.: Untersuchungen zum Sauerstoffverbrauch von Peritonealmakrophagen und Leberzellen unter dem Einfluß von Pyridinnucleotiden und Substraten des Kohlenhydratstoffwechsels. *Med. Diss., Mainz* 1976
- GILLESPIE, E.: Compound 48/80 decreases adenosine-3',5'-monophosphate formation in rat peritoneal mast cells. *Experientia* 29(4), 447-448 (1973)
- ICHIKAWA, A.: Fine structural changes in response to hormonal stimulation of the perfused canine pancreas. *J. Cell Biol.* 24, 369-385 (1965)
- JAKUES, R. and M. RÜEGG: Age and sex differences in mast cell count and histamine content. *Agents and Actions* 1, 144-147 (1970)
- JOHANSEN, T. and N. CHAKRAVARTY: Dependence of histamine release from rat mast cells on adenosine triphosphate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 275(4), 457-463 (1972)
- JOHANSEN, T. and N. CHAKRAVARTY: The relation of adenosine triphosphate content of rat mast cell to anaphylactic and compound 48/80-induced histamine release. *Acta physiol. scand. Suppl.* 396, 121 (1973)
- JOHNSON, A.R. and N.C. MORAN: The selective release of histamine from rat mast cells by compound 48/80 and antigen. *Am. J. Physiol.* 216, 453-459 (1969)

JOHNSON, A.R. and N.C.MORAN: Interaction of toluidine blue and rat mast cells: Histamine release and uptake and release of the dye.

J. Pharmacol. exp. Ther. 189(1), 221-234 (1974)

JOHNSON, A.R., N.C.MORAN and St.E.MAYER: Cyclic-AMP-content and histamine release in rat mast cells.

J. Immunology 112(2), 511-519 (1974)

KAHL, G.F.: Untersuchungen zum Sauerstoffverbrauch isolierter Peritonealmastzellen der Ratte während der Histaminfreisetzung durch Substanz 48/80.

Med. Diss., Hamburg 1966

KALINER, M. and K.F.AUSTEN: Cyclic-AMP, ATP and reversed anaphylactic histamine release from rat mast cells.

J. Immunology 112(2), 664-674 (1974)

LAGUNOFF, D.: The mechanism of histamine release from mast cells.

Biochem. Pharmacol. 21(14), 1889-1896 (1972)

LAGUNOFF, D. and E.P.BENDITT: Mast cell degranulation and histamine release observed in a new in vitro system.

J. exp. Med. 112, 571-580 (1960)

LICHTENSTEIN, L.M.: The immediate allergic response:

In vitro separation of antigen activation, decay and histamine release.

J. Immunology 107(4), 1122-1130 (1971)

LICHTENSTEIN, L.M. and R.DeBERNARDO: The immediate

allergic response: In vitro action of cyclic-AMP-active and other drugs on the two stages of histamine release.

J. Immunology 107(4), 1131-1136 (1971)

- LICHTENSTEIN, L.M. and S.MARGOLIS: Histamine release in vitro: Inhibition by catecholamines and methylxanthines. *Science* 161, 902-903 (1968)
- LOEFFLER, L.J., W.LOVENBERG and A.SJOERDSMA: Effects of dibutyryl-3',5'-cyclic adenosine monophosphate, phosphodiesterase inhibitors and prostaglandin E_1 on compound 48/80 induced histamine release from rat peritoneal mast cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 20, 2287-2297 (1971)
- MONGAR, J.L. and B.A.V.PERERA: Oxygen consumption during histamine release by antigen and compound 48/80. *Immunology* 8, 511-518 (1965)
- MORAN, N.C., B.UVNÄS and B.WESTERHOLM: Release of 5-hydroxytryptamine and histamine from rat mast cells. *Acta physiol. scand.* 56, 26-41 (1962)
- NOSAL, R., S.A.SLORACH and B.UVNÄS: Quantitative correlation between degranulation and histamine release following exposure of rat mast cells to compound 48/80 in vitro. *Acta physiol. scand.* 80(2), 215-221 (1970)
- ORANGE, R.P., M.A.KALINGER, P.J.LARAIA, and K.F.AUSTEN: Immunological release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis from human lung. II. Influence of cellular levels of cyclic AMP. *Fed. Proc.* 30(6), 1725-1729 (1971)
- PADAWER, J. and A.S.GORDON: Peritoneal fluid mast cells: Their number and morphology in rats of various body weights (ages). *J. Gerontol.* 11, 268-272 (1956)

PARROT, J.L.: Sur la réaction cellulaire de l'anaphylaxie.
Son caractère aerobic.

C. R. Soc. Biol. (Paris) 136, 361 (1942); zit. nach:
KAHL, G.F., Med. Diss., Hamburg, 1966

PERERA, B.A.V. and J.L.MONGAR: Effect of anoxia, glucose
and thioglycollate on anaphylactic and 48/80-induced
histamine release in isolated rat mast cells.

Immunology 8, 519-525 (1965)

PETERSON, C.: Inhibitory action of Antimycin A on
histamine release from isolated rat mast cells.

Acta pharmacol. toxicol. 34(5), 347-355 (1974a)

PETERSON, C.: Histamine release induced by compound 48/80
from isolated rat mast cells: Dependence on endogenous
ATP.

Acta pharmacol. toxicol. 34(5), 356-367 (1974b)

PETERSON, C. and B.DIAMANT: Observations on energy
metabolism of isolated rat mast cells and histamine
release induced by ATP and 48/80.

Acta pharmacol. toxicol. 29, Suppl.4, 45 (1971)

PETERSON, C. and B.DIAMANT: Endogenous ATP in isolated rat
mast cells and its relation to histamine release
induced by compound 48/80.

Acta pharmacol. toxicol. 31, Suppl.1, 80 (1972)

PETERSON, C. and B.DIAMANT: Utilization of endogenous
ATP during histamine release from isolated rat
mast cells.

Acta physiol. scand., Suppl.396, 121 (1973)

PETERSON, C. and B.DIAMANT: Inhibitory action of exogenous
adenosine-5'-triphosphate on glycolysis in isolated
rat mast cells: Significance for histamine release.

Acta pharmacol. toxicol. 34(5), 325-336 (1974a)

- PETERSON, C. and B. DIAMANT: Increased utilization of endogenous ATP in isolated rat mast cells during histamine release induced by compound 48/80. *Acta pharmacol. toxicol.* 34(5), 337-346 (1974b)
- RALL, T.W. and E.W. SUTHERLAND: Adenylcyclase. II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine-3',5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. *J. biol. Chem.* 237, 1228-1232 (1962); zit. nach: SUTHERLAND, E.W. and G.A. ROBINSON, *Pharmacol. Rev.* 18, 145-161 (1966)
- RÖHLICH, P., P. ANDERSON and B. UVNÄS: Electron microscope observations on compound 48/80 induced degranulation in rat mast cells. I. Evidence for sequential exocytosis of storage granules. *J. Cell Biol.* 51, 465-483 (1971)
- ROLF, G., G. ANDERSSON and H. COLLEDAHL: Relationship between antigen induced histamine release and cyclic AMP-level in human leukocytes. *Acta allergologica* 29(4), 248-255 (1974)
- SCHMUTZLER, W., G. POBLETTE-FREUNDT and R. DERWALL: Studies on the role of c-AMP in the regulation of the anaphylactic histamine release from guinea-pig lung. *Agents and Actions* 3(3), 192-193 (1973)
- SHORE, P.A., A. BURKHALTER and V.H. COHN: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 127, 182-186 (1959)
- SLORACH, S.A.: Histamine and heparin release from isolated rat mast cells exposed to compound 48/80. *Acta physiol. scand.* 82(1), 91-97 (1971)

- SUGIYAMA, K.: Calcium-dependent histamine release with degranulation from isolated rat mast cells by adenosine-5'-triphosphate.
Jap. J. Pharmacol. 21(2), 209-226 (1971)
- SUTHERLAND, E.W. and G.A. ROBINSON: The role of cyclic-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones.
Pharmacol. Rev. 18, 145-161 (1966)
- THON, I.L. and B. UVNÄS: Degranulation and histamine release, two consecutive steps in the response of rat mast cells to compound 48/80.
Acta physiol. scand. 71, 303-315 (1967)
- TIZARD, I.R. and W.L. HOLMES: Degranulation of sensitized rat peritoneal mast cells in response to antigen, compound 48/80 and polymyxin B. A scanning electron microscope study.
Int. Arch. Allergy appl. Immunology 46(6), 867-879 (1974)
- UVNÄS, B.: The molecular basis for the storage and release of histamine in rat mast cell granules.
Life Sci. 14(12), 2355-2366 (1974)
- UVNÄS, B. and I.L. THON: Isolation of biological intact mast cells.
Exp. Cell Res. 18, 512-520 (1959)
- UVNÄS, B. and I.L. THON: Evidence for enzymatic histamine release from isolated rat mast cells.
Exp. Cell Res. 23, 45-57 (1961)
- WOLF, J. and H.J. MERKER: Ultrastruktur und Bildung von Poren im Endothel von porösen und geschlossenen Kapillaren.
Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 73, 174-191 (1966)

LEBENS LAUF

Am 19. Februar 1950 wurde ich als ältestes Kind des Landwirtes Günther Maaß und seiner Ehefrau Anneliese geb. Geil in Nack, Kreis Alzey geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit in Nack besuchte ich das Staatliche Gymnasium am Römerkastell in Alzey, wo ich am 18. 6. 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1968/69 immatrikulierte ich mich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

Nach drei Semestern Studium der Mathematik und Physik wechselte ich im Sommersemester 1970 in die medizinische Fakultät über. Hier bestand ich im Oktober 1972 die ärztliche Vorprüfung und beendete im Dezember 1975 die ärztliche Prüfung.

Seit Februar 1976 bin ich am St. Josefs-Hospital in Wiesbaden als Medizinalassistentin tätig.

Die Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit führte ich im Jahre 1974 am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz durch.

Chemoprint-Druck 63 Gießen Frankfurter Str. 131 Ruf (06 41) 2 17 12